



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CARLOS EDUARDO DELFINO VIEIRA

**BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS E GENOTÓXICOS EM
DUAS ESPÉCIES DE PEIXES NEOTROPICAIS PARA
AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA EM ÁREAS
AGRÍCOLAS NO NORTE DO PARANÁ**

Londrina
2014

CARLOS EDUARDO DELFINO VIEIRA

**BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS E GENOTÓXICOS EM
DUAS ESPÉCIES DE PEIXES NEOTROPICAIS PARA
AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA EM ÁREAS
AGRÍCOLAS NO NORTE DO PARANÁ**

Dissertação apresentada como um dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pelo curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina

Orientadora: Prof^a Dr^a Cláudia Bueno dos Reis
Martinez

Londrina
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca
Central da Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

V658b Vieira, Carlos Eduardo Delfino.

Biomarcadores bioquímicos e genotóxicos em duas espécies de peixes neotropicais para avaliação da contaminação aquática em áreas agrícolas no norte do Paraná / Carlos Eduardo Delfino Vieira. – Londrina, 2014.
145 f. : il.

Orientador: Cláudia Bueno dos Reis Martinez.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2014.

Inclui bibliografia.

1. Peixe – Toxicologia – Teses. 2. Biotransformação (Metabolismo) – Teses. 3. Estresse oxidativo – Teses. 4. Monitoramento biológico – Teses. 5. Água – Poluição – Teses. I. Martinez, Cláudia Bueno dos Reis. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

CARLOS EDUARDO DELFINO VIEIRA

**BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS E GENOTÓXICOS EM DUAS
ESPÉCIES DE PEIXES NEOTROPICAIS PARA AVALIAÇÃO DA
CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA EM ÁREAS AGRÍCOLAS NO NORTE
DO PARANÁ**

Dissertação apresentada como um dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pelo curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Bueno dos
Reis Martinez
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Adalto Bianchini
Universidade Federal do Rio Grande- FURG

Prof. Dr. Halley Caixeta Oliveira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 27 de fevereiro de 2014.

*Dedico este trabalho aos meus pais por todo apoio e incentivo
Certamente esta conquista é o resultado do amor, dedicação
e da experiência de vida que me foi passado por vocês!*

*“Quando os ventos de mudança sopram, umas pessoas
levantam barreiras, outras constroem moinhos de vento”*

Érico Veríssimo

AGRADECIMENTOS

Indigno eu seria se atribuisse esta conquista apenas aos meus únicos esforços, pois este trabalho contou com a participação de muitas pessoas, as quais não bastariam um muitíssimo obrigado. Deixo aqui expressos meus sinceros agradecimentos às seguintes instituições e pessoas, sem as quais o presente trabalho não teria sido possível...

Primeiramente agradeço a Deus, por me dar forças todos os dias para lutar contra os obstáculos, coragem para enfrentar os desafios e por todas as graças que concede à minha vida;

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Cláudia Martinez. Obrigado por mesmo sem me conhecer ter aberto as portas de seu laboratório e ter dado a oportunidade de realizar este sonho. Obrigado por todo conhecimento compartilhado, confiança, amizade, paciência, pela agradável convivência no laboratório e pelos momentos de descontração. Por toda sua capacidade, competência e humanidade, com certeza é um espelho para todos nós!

A minha família, em especial aos meus pais que sempre me apoiaram nas minhas decisões, que souberam transmitir grandes valores e acima de tudo pelo amor incondicional, pela liberdade de me deixarem voar e aos meus irmãos por todo apoio, carinho e compreensão. Obrigado por compreenderem minha ausência nestes últimos anos. Amo vocês!

À professora Sílvia Sofia, pelos ensinamentos transmitidos, conselhos, carinho e atenção!

Aos professores Bruno Galindo e Lindalva Pereira, pela grande contribuição à minha iniciação científica;

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas da UEL pela oportunidade concedida;

À Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná pela concessão de bolsa de estudo;

À banca de qualificação, professor Halley Caixeta e professor Paulo Meletti, pelas contribuições;

À minha banca examinadora, professor Dr. Adalto Bianchini, prof. Dr. Halley Caixeta e prof. Dr^a. Cláudia Martinez pela disponibilidade em participar desta avaliação e pelas contribuições à melhoria do trabalho;

À Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina (EPUEL) pelo fornecimento dos peixes;

A todos os colegas do Laboratório de Ecofisiologia Animal, pela indispensável ajuda nos trabalhos em campo, pelas palavras amigas e apoio em momentos de dificuldade. Em especial à Bruna e a Lu, pela parceria em todas as horas, seja enfrentando todas as dificuldades dos trabalhos de campo, auxiliando nas execuções laboratoriais, longas conversas, tanto fora quanto dentro da UEL e pelo companheirismo.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Toxicologia Aquática- INCT-TA-CNPq pelo apoio financeiro na realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Microcontaminantes Orgânicos e Ecotoxicologia (CONECO) e ao Laboratório de Análises de Compostos Orgânicos e Metais (LACOM), ambos da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), especialmente à Patrícia Gomes Costa e Gilberto Fillmann, pela parceria neste trabalho com a realização das análises cromatográficas.

Aos amigos de graduação e república: Digo, Bruno, Wirso, Xandê, Gazal, Gean, Carol, Déia, Raul, Re, Mah e Same, pela ótima convivência durante estes últimos anos, por todos os momentos alegres e tristes que passamos juntos, pelas conversas, risadas, momentos de descontração, ombro amigo e amizade sempre presente, mesmo que às vezes, vocês estivessem fisicamente distantes!

Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente fizeram parte da realização deste sonho. Muito Obrigado!

VIEIRA, C.E.D. **Biomarcadores bioquímicos e genotóxicos em duas espécies de peixes neotropicais para avaliação da contaminação aquática em áreas agrícolas no norte do Paraná.** 2014. 145 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

RESUMO

A contaminação química de origem agrícola nos ecossistemas aquáticos constitui um problema de escala global e os agrotóxicos que atingem estes ambientes podem promover impactos em múltiplos níveis, desde o molecular até o de população e comunidade. A região norte do Paraná destaca-se no cenário agrícola brasileiro, o que traz como consequência a contaminação dos seus corpos hídricos. Desta forma, estudos de monitoramento de ecossistemas aquáticos nestas áreas são fundamentais, a fim de avaliar a qualidade da água bem como o estado de saúde da biota ali residente. O presente trabalho teve como objetivos: I) avaliar a qualidade da água dos ribeirões Apertados (AP), Jacutinga (JC) e Godoy (GD), por meio de biomarcadores bioquímicos e genotóxicos no peixe *Prochilodus lineatus*, submetidos a testes *in situ* e verificar os efeitos de variações sazonais sobre as respostas destes biomarcadores e II) comparar as respostas de biomarcadores bioquímicos e genotóxicos na espécie *Astyanax altiparanae* expostos aguda (testes *in situ*) e cronicamente (residentes) em três lagoas localizadas em áreas agrícolas. Também foram analisadas amostras de água e sedimento de alguns destes locais a fim de caracterizá-los quanto à presença de metais e alguns agrotóxicos. Parâmetros bioquímicos, tais como as enzimas de biotransformação 7-etoxiresorufina-O-desetilase (EROD) e glutatona-S-transferase (GST), tióis não protéicos (NPSH), lipoperoxidação (LPO), carbonilação de proteínas (PCO), acetilcolinesterase (AChE) e proteínas semelhantes à metalotioneínas (PSMT), foram avaliados no fígado e brânquias dos peixes, além dos biomarcadores genotóxicos (danos no DNA e a ocorrência de micronúcleo e alterações nucleares) analisados nos eritrócitos. De acordo com os dados obtidos com os biomarcadores analisados isolados e conjuntamente em um índice integrado de respostas de biomarcadores (IBR), os ribeirões AP e JC apresentaram a pior qualidade ambiental, corroborando os dados de análises químicas na água e sedimentos, enquanto o ribeirão GD apresentou uma melhor qualidade ambiental, em virtude de estar melhor protegido da entrada de agrotóxicos. A relação entre a sazonalidade e as respostas dos biomarcadores também foi avaliada, apresentando diferenças importantes entre as estações, que podem estar relacionadas com a temperatura e o maior aporte de contaminantes na época chuvosa. Os resultados comparativos de peixes da espécie *A. altiparanae* residentes e confinados em áreas agrícolas mostraram diferenças em alguns biomarcadores de exposição como a GST e o conteúdo de NPSH, diferenças estas que podem estar relacionadas com fatores adaptativos à exposição crônica. Já os biomarcadores de efeito, como danos oxidativos, genéticos e neurotóxicos mostraram semelhanças entre os indivíduos coletados e transplantados nestas áreas agrícolas. Neste trabalho os biomarcadores que apresentaram as respostas mais sensíveis e consistentes foram os biomarcadores de efeito, como a lipoperoxidação (LPO), danos genéticos (quebras no DNA) e neurotóxicos (AChE), sendo estes, desta forma, potenciais biomarcadores para diagnosticar e monitorar a qualidade ambiental de ambientes aquáticos dulcícolas em áreas rurais. As espécies *P. lineatus* e *A. altiparanae* podem ser considerados bons biomonitoradores de contaminação aquática e modelos biológicos adequados para futuros programas de biomonitoramento nesta região.

Palavras-chave: Biotransformação. Estresse oxidativo. Biomonitoramento. *Astyanax altiparanae*. *Prochilodus lineatus*.

VIEIRA, C.E.D. **Biochemical and genotoxic biomarkers in two neotropical fishes for the assessment aquatic contamination in agricultural areas in northern Paraná.** 2014. 145 p. Dissertation (Master's Degree Dissertation in Biological Science) – State University of Londrina, Londrina. 2014

ABSTRACT

Chemical contamination from agricultural sources in aquatic ecosystems is a problem of global scale and pesticides that affect these environments can promote impacts at multiple levels, from the molecular to the population and community. The northern region of Paraná state stands in the Brazilian agricultural scenario that brings as a consequence the contamination of their water bodies. Thus, monitoring studies of aquatic ecosystems in these areas are fundamental in order to assess the water quality and the health status of the resident biota. The objectives of the present study are: I) to evaluate the water quality of Apertados (AP), Jacutinga (JC) and Godoy (GD) streams, through biochemical and genotoxic biomarkers in the fish *Prochilodus lineatus* submitted to *in situ* tests and to verify the effects of seasonal variations on the responses of these biomarkers and II) to compare the responses of biochemical and genotoxic biomarkers in the fish *Astyanax altiparanae* acutely (*in situ* tests) and chronically (residents) exposed in three lakes located in agricultural area. Water and sediment samples from some of these sites were also analyzed for the presence of metals and some pesticides. Biochemical parameters such as the biotransformation enzymes etoxiresorufina-7-O-desetilase (EROD) and glutathione-S-transferase (GST), non-protein thiols (NPSH), lipid peroxidation (LPO), protein carbonylation (PCO), acetylcholinesterase (AChE) and metallothionein-like proteins (MT-like), were evaluated in the liver and gills of fish, and biomarkers of genotoxic (DNA damage and occurrence of micronuclei and nuclear abnormalities) were analyzed in erythrocytes. According to the data obtained with the biomarkers analyzed alone or in an integrated biomarker response index (IBRv2), AP and JC streams showed the worst environmental quality corroborating data of chemical analysis in water and sediments, while GD stream presented better environmental quality, probably due to the fact that this stream is better protected from the input of pesticides. The relationship between seasonality and the responses of the biomarkers was also evaluated, with significant differences between seasons, which may be related to the temperature and the higher amount of contaminants in the rainy season. The comparative results of resident and caged *A. altiparanae* showed differences in some biomarkers of exposure, such as GST and NPSH, which might be related to adaptive factors to the chronic exposed. Biomarkers of effect, such as oxidative, genetic and neurotoxic damages showed similarities between individuals collected and caged in these agricultural areas. Overall, in this work, the biomarkers that showed the most sensitive and consistent responses were the biomarkers of effect, such LPO, genetic (DNA break) and neurotoxic (AChE) damages and they can be suggested as potential biomarkers for the assessment and monitoring of the environmental quality of freshwater aquatic environments in rural areas. The fish species *P. lineatus* and *A. altiparanae* can be considered good biomonitoring for aquatic contamination and suitable as biological models for future biomonitoring programs in this region.

Keywords: Biotransformation. Oxidative stress. Biomonitoring. *Astyanax altiparanae*. *Prochilodus lineatus*.

LISTA DE ABREVIATURAS

OH	- radical hidroxil
$^1\text{O}_2$	- oxigênio singlet
4-HNE	- 4-hidroxinonenal
ACh	- acetilcolina
AChE	- acetilcolinesterase
AENS	- alterações eritrocíticas nucleares
ANDA	- Associação Nacional para Difusão de Adubos
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BSA	- albumina de soro bovino
CAT	- catalase
CDNB	- 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CONAMA	- Conselho Nacional do Meio Ambiente
DDD	- diclorodifenildicloroetano
DDE	- diclorodifenildicloroetileno
DDT	- diclorodifeniltricloroetano
DNA	- ácido desoxirribonucléico
DNPH	- dinitrofenilhidrazina
EI	- eritrócito imaturo
EPUEL	- Estação de Piscicultura da UEL
EROD	- 7-etoxiresorufina-O-deetilase
ERRO	- espécie reativa de oxigênio
GC-ECD	- cromatógrafo a gás com detector de captura de elétrons
GC-MS	- cromatógrafo a gás com espectrometria de massa
GPX	- glutathione peroxidase
GSH	- glutathione reduzida
GSSG	- glutathione oxidada
GST	- glutathione-S-transferase
H_2O_2	- peróxido de hidrogênio
HCB	- hexaclorobenzeno
HCH	- hexaclorociclohexano
HPAS	- hidrocarbonetos poliaromáticos
IBGE	- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IBR	- Índice Integrado de Resposta de Biomarcadores
IBRv2	- Índice Integrado de Resposta de Biomarcadores versão 2
IPARDES	- Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social.
$\text{L}\cdot$	- radical alquila
LDL	- lipoproteína de baixa densidade
$\text{LO}\cdot$	- radical alcóxila
$\text{LOO}\cdot$	- radical peróxila
LPO	- lipoperoxidação

MAPA	- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MDA	- malondialdeído
MN	- micronúcleo
MT	- metalotioneína
NPSH	- tióis não proteicos
O ₂ ⁻	- ânion superóxido
OD	- oxigênio dissolvido
OP	- organofosforado
PCBs	- bifelinas policloradas
PCO	- proteínas carboniladas
PSMT	- proteínas semelhantes à metalotioneínas
RNA	- ácido ribonucleico
-SH	- grupamento tiol
SINDAG	- Sindicato Nacional da Indústria de Agrotóxicos
SOD	- superóxido dismutase
TBARS	- substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico
TCMX	- tetracloro-m-xileno
TNB	- tiolato
UFPR	- Universidade Federal do Paraná

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	14
1.1 INTRODUÇÃO	15
1.1.1 Contaminação Aquática	15
1.1.2 Uso de Agrotóxicos no Brasil e a Contaminação Aquática.....	16
1.1.3 Biomarcadores de Contaminação Ambiental	20
1.1.3.1 Biomarcadores bioquímicos	22
1.1.3.2 Biotransformação de xenobióticos.....	23
1.1.3.3 Biomarcadores de estresse oxidativo.....	25
1.1.3.4 Biomarcador de neurotoxicidade: Acetilcolinesterase	28
1.1.3.5 Metalotioneínas	29
1.1.3.6 Biomarcadores genotóxicos	30
1.1.4 Testes in situ no Monitoramento Ambiental.....	32
1.1.5 Peixes como Organismos Biomonitores	33
1.1.5.1 Prochilodus lineatus	33
1.1.5.2 Astyanax altiparanae	34
1.2 OBJETIVOS	36
1.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
CAPÍTULO II - MANUSCRITO I	50
2.1 INTRODUÇÃO	51
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	53
2.2.1 Área de Estudo.....	53
2.2.2 Organismos-Testes e Confinamento dos Peixes	55
2.2.3 Análises Químicas na Água e Sedimentos.....	56
2.2.3.1 Metais	56
2.2.3.2 Caracterização dos locais quanto a presença de agrotóxicos	57
2.2.4 Amostragem	58
2.2.5 Biomarcadores	58
2.2.5.1 Etoxiresorufina-O-deetilase (EROD)	58

2.2.5.2	Glutathiona-S-transferase (GST)	59
2.2.5.3	Tióis não proteicos (NPSH)	59
2.2.5.4	Lipoperoxidação (LPO)	59
2.2.5.5	Carbonilação de proteínas (PCO)	60
2.2.5.6	Proteínas semelhantes à metalotioneínas (PSMT)	60
2.2.5.7	Acetilcolinesterase (AChE)	61
2.2.5.8	Proteínas totais	61
2.2.5.9	Biomarcadores genotóxicos	61
2.2.6	Índice Integrado de Respostas de Biomarcadores (IBR)	63
2.2.7	Análises Estatísticas	63
2.3	RESULTADOS	64
2.3.1	Parâmetros Físicos e Químicos da Água	64
2.3.2	Análises de agrotóxicos na água e sedimento	65
2.3.3	Análises de Metais na Água e Sedimento	65
2.3.4	Biomarcadores	69
2.3.5	Índice Integrado de Respostas de Biomarcadores (IBR)	78
2.4	DISCUSSÃO	80
2.5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

CAPÍTULO III- MANUSCRITO II	102	
3.1	INTRODUÇÃO	103
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	104
3.2.1	Área de Estudo	104
3.2.2	Organismos-Teste e Delineamento Experimental	106
3.2.3	Análises de Agrotóxicos na Água e Sedimentos	106
3.2.4	Amostragem	107
3.2.5	Análises Bioquímicas	108
3.2.5.1	Etoxiresorufina-O-deetilase (EROD)	108
3.2.5.2	Glutathiona-S-transferase (GST)	109
3.2.5.3	Tióis não proteicos (NPSH)	109
3.2.5.4	Lipoperoxidação (LPO)	109
3.2.5.5	Acetilcolinesterase (AChE)	110
3.2.5.6	Proteínas totais	110

3.2.6	Análises Genotóxicas	110
3.2.7	Índice Integrado de Resposta de Biomarcadores (IBR)	112
3.2.8	Análises Estatísticas.....	113
3.3	RESULTADOS	113
3.3.1	Biometria dos Peixes.....	113
3.3.2	Parâmetros Físicos e Químicos da Água e Análises de Agrotóxicos	114
3.3.3	Biomarcadores	117
3.3.4	Comparação entre Peixes “Engaiolados” e Coletados: IBR	124
3.4	DISCUSSÃO	126
3.5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	133
CAPÍTULO IV		142
CAPÍTULO V		143

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação foi escrita e organizada com a finalidade de facilitar a apresentação e discussão dos resultados obtidos ao longo do mestrado.

O **CAPÍTULO I** contém uma sucinta revisão bibliográfica sobre os principais assuntos abordados ao longo do trabalho, fornecendo ao leitor o embasamento teórico básico e fundamental para justificar a relevância deste estudo. O capítulo I também traz os objetivos gerais que nortearam o desenvolvimento desta dissertação, correspondentes aos conteúdos abordados nos capítulos subsequentes.

Os resultados são apresentados na forma de dois manuscritos, correspondentes aos **CAPÍTULOS II e III**, que contêm uma breve introdução, descrição metodológica, apresentam seus resultados e os discutem para, em conjunto, alcançar os objetivos propostos.

No final desta dissertação encontra-se o **CAPÍTULO IV**, que traz as conclusões gerais sobre os resultados obtidos neste trabalho, seguido pelo **CAPÍTULO V** que apresenta os comentários e considerações finais, sintetizando de forma integradora todos os resultados do trabalho, e evidências que precisavam ser unificadas para terem maior significado.

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUÇÃO

1.1.1 Contaminação Aquática

A raiz de grande parte dos problemas ambientais nos remete aos efeitos do acelerado crescimento populacional. Segundo a Organização das Nações Unidas, no ano de 2011 a população mundial atingiu a casa dos 7 bilhões de habitantes. Um maior número de pessoas significa um maior consumo dos recursos renováveis e não-renováveis, maior necessidade de produção de alimentos, conseqüentemente levando a uma crescente expansão agrícola, cada vez mais dependente do uso de agrotóxicos (Caldas e Souza, 2000). Aliado a este fator, o aumento no uso agrícola e industrial dos recursos hídricos superficiais e subterrâneos, bem como a poluição resultante, são causas de graves alterações no ciclo hidrológico e de aumentos consideráveis de poluentes orgânicos e inorgânicos, com efeitos consideráveis na biota aquática e nas condições físicas e químicas da água.

Lagos, rios e áreas costeiras marinhas têm recebido descartes derivados diretamente de indústrias, agricultura e estabelecimentos urbanos ou indiretamente da deposição atmosférica de emissões transportadas por via aérea. Assim, uma mistura complexa de substâncias tóxicas está presente nestas águas, com um crescente número de contaminantes que representam uma ameaça tanto a ecossistemas aquáticos quanto à saúde e bem-estar das populações humanas (Pollack et al., 2003).

Os xenobióticos são definidos como substâncias químicas estranhas ao sistema biológico. Muitos dos xenobióticos que são despejados dentro dos corpos d'água podem ser tóxicos para os organismos aquáticos. Se a exposição a um xenobiótico será ou não letal vai depender da concentração da substância na água, das características da água em relação a parâmetros como pH, dureza, oxigênio dissolvido, temperatura e condutividade, e do tempo de duração da exposição do peixe ao agente tóxico (Jobling, 1995).

1.1.2 Uso de Agrotóxicos no Brasil e a Contaminação Aquática

O processo produtivo agrícola brasileiro está cada vez mais dependente dos agrotóxicos e fertilizantes químicos. A lei dos agrotóxicos (Brasil, 1989) e o decreto que regulamenta esta lei (Brasil, 2002) definem que essas substâncias são: “os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos”.

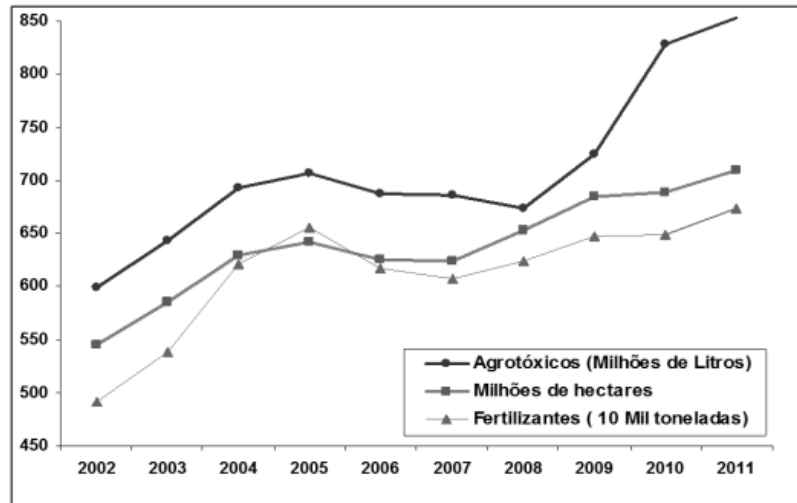
Segundo dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e do Observatório da Indústria dos Agrotóxicos da UFPR, divulgados em 2012, enquanto, nos últimos dez anos, o mercado mundial de agrotóxicos cresceu 93% o mercado brasileiro cresceu 190%. Em 2008, o Brasil ultrapassou os Estados Unidos, se consolidando como o maior mercado e com maior ritmo de expansão no consumo de agrotóxicos em todo o mundo. Apenas na safra que envolve o segundo semestre de 2010 e o primeiro semestre de 2011, foram utilizados cerca de 853 milhões de litros de agrotóxicos em todo território nacional (Fig. 1.1) (ANVISA & UFPR, 2012).

Existe uma concentração do mercado de agrotóxicos em determinadas categorias de produtos. Os herbicidas, por exemplo, representaram 45% do total de agrotóxicos comercializados. Os fungicidas respondem por 14% do mercado nacional, os inseticidas 12% e as demais categorias de agrotóxicos 29% (ANVISA & UFPR, 2012).

Por sua vez, o estado do Paraná ganhou um lugar de destaque no cenário agrícola brasileiro. Segundo dados do IBGE, em 2010 o estado foi líder em culturas como o milho e o feijão, além de figurar entre os maiores produtores nacionais de soja, trigo e cana-de-açúcar. Conseqüentemente, o estado é o terceiro no ranking nacional de consumo de agrotóxicos (Fig. 1.2), o que equivale a 14,3% do total vendido no país (ANVISA & UFPR, 2012). O Paraná utiliza 12 Kg de agrotóxico por hectare ao ano, enquanto a média brasileira de consumo é um terço menor, de 4 Kg/ha/ano. As regiões que mais consomem são Cascavel (23 kg/ha/ano), Londrina

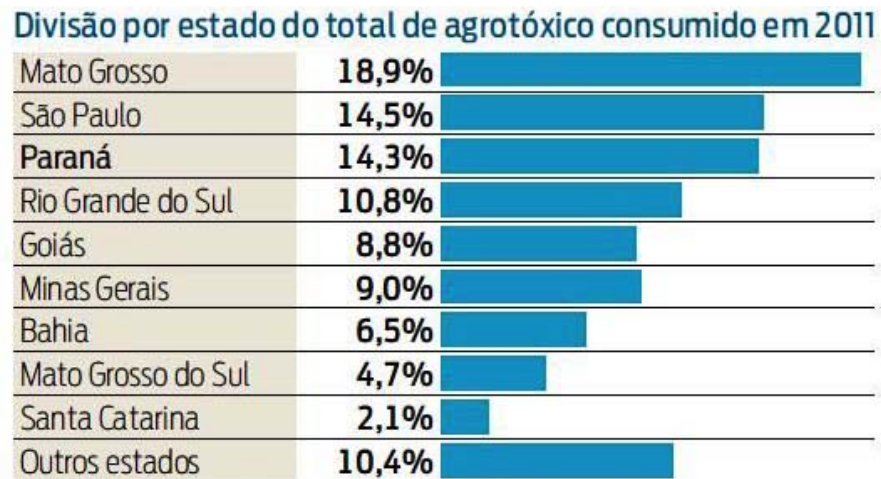
(21 kg/ha/ano) e Ponta Grossa (20 kg/ha/ano). Nestas regiões, há também o uso de agrotóxico com o máximo nível de periculosidade (IPARDES, 2010).

Figura 1.1 - Produção agrícola e consumo de agrotóxicos e fertilizantes químicos nas lavouras do Brasil, de 2002 a 2011.



Fonte: SINDAG, 2009 e 2011; ANDA, 2011; MAPA, 2010.

Figura 1.2- Divisão por estado do total de agrotóxicos consumidos em 2011

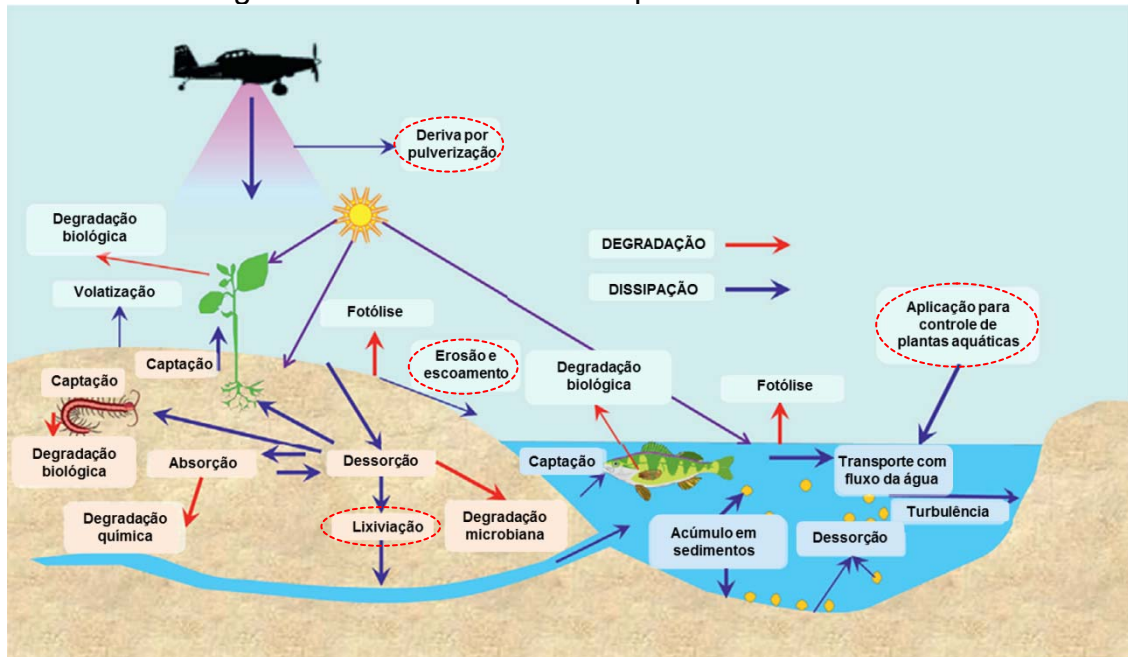


Fonte: Sindicato Nacional da Indústria de produtos para Defesa Agropecuária (2009 e 2011), IBGE (2012), Associação Nacional para Difusão de Adubos (2011) e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2010).

Os principais contaminantes de origem agrícola são os resíduos de fertilizantes e os agrotóxicos. Estima-se que 99,9% da quantidade de agrotóxicos utilizados nas plantações não atingem os alvos específicos, deixando grande parte

do volume utilizado livre para se deslocar nos diferentes compartimentos ambientais, como o solo e águas superficiais e subterrâneas (Belluck et al., 1991). Diversos agrotóxicos podem ser aplicados diretamente à superfície da água para o controle de plantas aquáticas, ou podem ser transportados para águas superficiais por meio de diferentes vias (Fig. 1.3). A deposição atmosférica por pulverização direta ou deriva da pulverização transportada por correntes aéreas são rotas potenciais de contaminação dos ecossistemas aquáticos. Uma vez aplicado, agrotóxicos podem ser dissipados ou degradados (Figura 1.3). A dissipação descreve o movimento do agrotóxico de um local para outro, podendo ocorrer através do escoamento superficial, deriva atmosférica, volatilização, lixiviação, adsorção e/ou dessorção de sedimentos e solos, ou absorção do ingrediente ativo por organismos. A degradação descreve a conversão de uma forma molecular do agrotóxico para outra e pode ser conduzida por processos químicos (por exemplo, hidrólise e oxidação), processos físicos (como por exemplo, fotólise), ou processos biológicos que ocorrem na microbiota, plantas e animais, normalmente levando a formação de produtos menos tóxicos do que o composto original (Solomon et al., 2014).

Figura 1.3- Representação esquemática das fontes, vias de dissipação e degradação de agrotóxicos em águas superficiais. Em destaque (círculos vermelhos) estão as principais vias de entrada de agrotóxicos aos ambientes aquáticos.



Fonte: adaptado de Solomon et al. (2014).

A preocupação com a contaminação de sistemas aquáticos superficiais e subterrâneos por agrotóxicos tem crescido no meio científico e tornou-se um problema de grande importância mundial. Estudos desenvolvidos em várias regiões do mundo têm mostrado que a porcentagem dos produtos utilizados na agricultura que atingem os ambientes aquáticos é geralmente baixa (Solomon et al., 1996). Entretanto, agrotóxicos persistentes e com grande mobilidade no ambiente têm sido detectados em águas superficiais e subterrâneas (Balnova e Mondesky, 1999).

Mesmo as concentrações dos agrotóxicos detectados na água sendo geralmente baixas (Higashi, 1991), isto, no entanto, não exclui a possibilidade de que concentrações muito altas venham a ocorrer após pesadas chuvas, especialmente quando as áreas ao redor de um pequeno córrego tenham sido recentemente tratadas com altas doses destes compostos (Dores e De-Lamonica-Freire, 2001). Mesmo em concentrações baixas, os agrotóxicos representam riscos para as espécies de organismos aquáticos que podem concentrar estes produtos até 1000 vezes. Desta maneira, não existe um nível seguro previsível para agrotóxicos na água, uma vez que a biomagnificação pode ocorrer (Eichelberger e Lichtenberg, 1971).

Agrotóxicos de forma geral podem afetar diretamente ou indiretamente a vida de muitos organismos não-alvo, como os peixes (Bretaud et al., 2000). Atualmente, muitos estudos têm sido desenvolvidos a fim de avaliar alterações causadas por estes xenobióticos em organismos aquáticos (Sancho et al., 2000). Os processos de transporte e impacto sobre organismos não-alvo são coordenados pelas taxas de degradação e pela biodisponibilidade desses agrotóxicos no solo ou na água. A biodisponibilidade do agrotóxico depende de suas características físico-químicas, bem como, das condições ambientais como clima e tipo de solo onde ele se encontra. Os efeitos sobre os peixes podem variar de acordo a espécie, o estágio de desenvolvimento, o tipo de produto aplicado, a concentração do produto e o tempo de exposição (Gluszczak et al., 2006; Cattaneo et al., 2008).

1.1.3 Biomarcadores de Contaminação Ambiental

A crescente preocupação sobre os efeitos de substâncias químicas no ambiente e em outras espécies, além da espécie humana, refletiu no surgimento da Ecotoxicologia, que se caracteriza como uma área de estudo preocupada com os efeitos de agentes químicos dentro do contexto da ecologia. Assim, a Ecotoxicologia pode ser definida como o estudo dos efeitos prejudiciais de substâncias químicas no ecossistema, incluindo o comportamento e as transformações desses agentes químicos no ambiente, bem como seus efeitos sobre os organismos vivos (Walker et al., 1996).

O objetivo da Ecotoxicologia Aquática é avaliar os riscos decorrentes da exposição a substâncias tóxicas, a fim de proteger e garantir a sustentabilidade das populações e comunidades, como as populações de peixes. O uso de biomarcadores desempenha um papel relevante para este objetivo, e a avaliação destas ferramentas em diferentes níveis de organização biológica deve ser cada vez mais incorporada em estudos de monitoramento aquático (Janz, 2013).

Biomarcadores são definidos como variações induzidas por agentes tóxicos em componentes moleculares ou celulares, processos, estruturas e funções, determináveis em sistemas biológicos ou amostras (Depledge, 1995) e sua principal característica é o potencial de antecipar prejuízos em níveis de organização

biológica superiores, sendo, portanto, utilizados de forma preventiva, antes que distúrbios ecológicos ocorram (Mouneyrac e Amiard-Triquet, 2013).

Um grande número de biomarcadores relacionados à exposição a poluentes tem sido proposto para avaliar a saúde dos peixes (Vander Oost et al., 2003) como, por exemplo, biomarcadores bioquímicos, endócrinos, metabólicos, hematológicos, iônicos e histopatológicos. A utilização destas ferramentas em programas de monitoramento oferece vantagens, pois eles são, normalmente, os primeiros a sofrerem alterações, apresentam boa sensibilidade, relativa especificidade e baixo custo de análise quando comparados às análises químicas convencionais (Huggett et al., 1992).

Os efeitos de poluentes para os organismos aquáticos podem ser avaliados em diferentes níveis de organização biológica, como demonstrado na Fig.1.4. Efeitos subletais, avaliados por meio dos biomarcadores, podem surgir como alterações de comportamento, crescimento, reprodução, estrutura tecidual, atividade de detoxificação, entre outros. Em exposições crônicas, os efeitos observados em nível individual podem evoluir para efeitos nas populações ou comunidades, podendo ser observadas através de alterações na diversidade, densidade e abundância das espécies (Rand et al., 1995).

Figura 1.4- Ordem sequencial dos efeitos de poluentes para os organismos aquáticos



Baseado em Van der Oost, 2003.

Uma das características mais importantes dos biomarcadores avaliados nos menores níveis de organização biológica, como em moléculas e células é o potencial

que estas respostas nos dão de antecipar mudanças em níveis superiores de organização biológica. Desta maneira, esta antecipação oferecida pelos biomarcadores pode ser utilizada de maneira preventiva, permitindo traçar estratégias de remediação que possam ser desenvolvidas antes que danos ambientais e ecológicos irreversíveis ocorram (Cajaraville et al., 2000). Desta forma, devem ser selecionados biomarcadores capazes de indicar se o organismo foi exposto a poluentes (biomarcadores de exposição) e/ou se a magnitude da resposta ao poluente afeta o bem estar do organismo (biomarcadores de efeito) (Cajaraville et al., 2000).

Recentemente, diversos autores têm sugerido a aplicação de metodologias que integram as respostas de diferentes biomarcadores em um único valor ou gráfico, pois permite uma melhor compreensão dos resultados e implantação em larga escala dessas ferramentas no monitoramento ambiental (Sanchez et al., 2011). Dentre esses índices, o "Índice Integrado de Resposta de Biomarcadores" (IBR), descrito por Beliaeff e Burgeot (2002), é um dos mais utilizados em estudos de campo e laboratório (Arzate-Cardenas e Martinez-Jeronimo, 2011; Serafim et al., 2012). Sanchez e colaboradores (2013) propuseram uma segunda versão para o índice (IBRv2) visando eliminar alguns pontos fracos da primeira versão, e obtiveram resultados satisfatórios.

Entre os biomarcadores mais utilizados em programas de monitoramento estão aqueles envolvidos em processos de detoxificação de xenobióticos, estresse oxidativo e danos genéticos. Estes biomarcadores serão tratados um pouco mais detalhadamente a seguir.

1.1.3.1 Biomarcadores bioquímicos

Os biomarcadores bioquímicos apresentam boa sensibilidade, relativa especificidade e baixo custo de análise, quando comparados às análises químicas (Schlenk, 2008). As alterações bioquímicas são as primeiras respostas detectadas e quantificadas frente à variação ambiental (Bucheli e Fent, 1995). Por isso, biomarcadores bioquímicos são frequentemente mais sensíveis que outros em

níveis mais elevados de organização biológica, como células, organismos e populações (Stegeman et al., 1992).

1.1.3.2 Biotransformação de xenobióticos

Diversos parâmetros bioquímicos têm sido utilizados como biomarcadores, principalmente as enzimas envolvidas no processo de detoxificação de xenobióticos e de seus metabólitos, ou seja, as enzimas de biotransformação e de defesa antioxidante. A biotransformação pode ser definida como a conversão catalisada por enzimas, de um composto xenobiótico em uma forma mais solúvel em água, sendo assim, mais facilmente excretada pelo organismo (Van der Oost et al., 2003).

A maior parte dos xenobióticos que entram nos organismos é lipofílica, permitindo a estes compostos entrarem nas células através das membranas lipídicas, além de serem transportados por lipoproteínas nos fluídos corpóreos. A biotransformação ou desintoxicação dos xenobióticos acontece geralmente em duas fases. A fase I consiste em reações de oxidação, redução e hidrólise, e os produtos formados são frequentemente mais reativos que os iniciais. A fase II consiste na conjugação do xenobiótico ou de substâncias reativas provenientes da fase I, a fim de serem eliminadas como substâncias inertes (Hodgson e Goldstein, 2001). A transformação metabólica ou biotransformação dos compostos químicos nos organismos é essencial para alterar a atividade biológica do composto e, conseqüentemente, cessar sua interação com a célula (Van der Oost et al., 2003).

As enzimas envolvidas na Fase I de biotransformação pertencem às famílias do citocromo P450, que são proteínas que contém um grupo heme envolvidas no transporte de elétrons. Localizam-se no retículo endoplasmático e ocorrem em todas as espécies de animais e plantas já estudados. Essas enzimas catalisam reações principalmente de hidroxilação, mas também de epoxidação, desalquilação, desaminação, sulfoxidação e desulfuração. Algumas formas de P450 catalisam várias reações, enquanto outras são mais específicas. Exemplos de xenobióticos que são biotransformados nesta fase são os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e muitos agrotóxicos (Di Giulio et al., 1995). A indução do P450 em fígado de peixes é reconhecida como um excelente biomarcador de exposição a

contaminantes orgânicos antropogênicos, como HPAs, bifenilas policloradas (PCBs), dioxinas e furanos (Goksoyr e Förlin, 1992). Através da alteração da estrutura química de compostos orgânicos, o citocromo P450 pode gerar compostos não tóxicos, menos ou mais tóxicos do que a substância original (Schlenk, 2008).

Em estudos ecotoxicológicos com peixes, a família de citocromo P450 mais estudada é a CYP1A. A atividade da etoxiresorufina-O-deetilase (EROD) é uma das reações catalisadas pela subfamília CYP1A (Bucheli e Fent, 1995). Ela catalisa uma reação de O-desalquilação, dependente de NADPH, na qual o substrato é a 7-etoxiresorufina, o produto formado na reação, a resorufina, pode ser medida espectrofluorimetricamente (Stegeman e Hann, 1994).

A biotransformação de Fase II consiste na conjugação de compostos tóxicos, diretamente ou subsequentes à Fase I, com pequenas moléculas endógenas presentes nas células (Hodgson et al., 2008). Diferente da Fase I, as enzimas envolvidas encontram-se geralmente no citosol. As glutathione-S transferases (GSTs) são uma família de isoenzimas envolvidas na conjugação de glutathione reduzida (GSH) com compostos eletrofílicos, reduzindo a probabilidade desses compostos se ligarem a outras moléculas celulares, como o DNA (Huggett et al., 1992).

Além de exercer o papel de conjugação, as GSTs apresentam outras funções importantes na desintoxicação. Estas enzimas parecem estar envolvidas no carregamento de compostos lipofílicos endógenos ou xenobióticos até os locais de ocorrência da biotransformação de Fase I, são capazes de se ligar covalentemente a metabólitos ativos, como os epóxidos gerados na Fase I, prevenindo que estes se liguem a outras moléculas e tem papel na conjugação de produtos gerados na lipoperoxidação (Di Giulio et al., 1995). A GST possui ainda papel importante no metabolismo de produtos secundários, incluindo a estabilização de flavonoides, a redução de hidroperóxidos a monohidróxi-álcoois em conjunto com as peroxidases durante o estresse oxidativo (Dixon e Laphorn, 2002).

A elevação na atividade da GST hepática foi relatada após exposição de organismos aquáticos a fungicidas, herbicidas, HPAs, PCBs e organoclorados (Kleinow et al., 1987; Almlí et al., 2002; Contardo-Jara et al., 2009).

prejudiciais, tais como a oxidação de lipídios, proteínas e DNA (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Ao longo da evolução, os organismos desenvolveram mecanismos adaptativos que lhes permitiram coexistir com a exposição aos oxidantes. As defesas contra esses agentes envolvem diversos mecanismos, como os de prevenção e reparo. A célula possui uma série de defesas capazes de evitar o efeito deletério das ERO geradas pelo metabolismo aeróbico. Estas defesas são comumente chamadas de defesas antioxidantes e podem ser sintetizadas endogenamente ou adquiridas através da dieta (Halliwell e Gutteridge, 2007). Estas defesas podem ser enzimáticas e não-enzimáticas. No primeiro caso, quando são expostos as ERO os organismos sintetizam enzimas antioxidantes, das quais podem-se citar: superóxido dismutase (SOD), que catalisa a dismutação de $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 ; catalase (CAT), enzima citoplasmática que catalisa a redução do H_2O_2 a H_2O e O_2 e a glutathione peroxidase (GPX) que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos para seus correspondentes álcoois às custas da conversão da GSH (glutathione reduzida) a GSSG (glutathione oxidada); todas elas abundantes nos tecidos de peixes (Lackner, 1998). No segundo caso, várias moléculas com propriedades antioxidantes consumidas na dieta como o α -tocoferol (vitamina E) e β -caroteno, selênio, ácido ascórbico (vitamina C), glutathione reduzida (GSH) diminuem a ação tóxica das ERO produzidas intra e extracelularmente (Yu, 1994).

O tripeptídeo GSH é o principal tiol não protéico da maioria das células, presente em altas concentrações (1-10 mM) (Meister, 1994; Mari et al., 2009). Devido à presença da cisteína em sua estrutura, a GSH é essencial na regulação de ligações dissulfeto de proteínas e na eliminação de agentes eletrofílicos e oxidantes (Deleve e Kaplowitz, 1991). Esta função antioxidante da GSH é mediada pelo grupo tiol (-SH) reativo da cisteína, que confere a capacidade redutora da GSH. A oxidação do grupamento -SH da GSH leva a formação da sua forma dissulfeto (GSSG) ou ácidos sulfênicos, sulfínico e sulfônico (Reischl et al., 2007).

As alterações relacionadas ao ataque de ERO podem ser causadas por sua excessiva formação e/ou ineficiência em sua interceptação pelas defesas antioxidantes, promovendo o estresse oxidativo. De forma simplificada, o estresse oxidativo ocorre quando há desequilíbrio entre a produção de oxidantes e a

capacidade das células em eliminá-los e pode ocorrer devido à ação de contaminantes, através da alteração na regulação redox celular, pelo metabolismo de compostos orgânicos por citocromos P450, ou ainda, pela presença de íons metálicos livres, gerando ciclos de reações oxidativas (Regoli et al., 2002a; Regoli et al., 2002b). As conseqüências do estresse oxidativo podem ser variadas, de acordo com o tipo celular e com sua intensidade. De acordo com Halliwell e Gutteridge (2007), os principais efeitos são: proliferação celular, adaptação com aumento das defesas celulares, dano celular, senescência e morte celular.

Em geral, agrotóxicos induzem alterações oxidativas, o que reflete no acúmulo de ERO, peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e DNA (Bagchi et al., 1995). Este grupo de substâncias tóxicas pode induzir estresse oxidativo por via diferentes mecanismos: (i) introduzindo ciclos redox (oxidação reversível) aceitando/doando elétrons aos constituintes celulares, podendo aumentar assim o nível de ERO, (ii) pelo metabolismo celular alguns agrotóxicos podem necessitar do envolvimento de redutores, como a glutatona, esgotando assim suas reservas e resultando na diminuição do potencial antioxidante, (iii) inativando enzimas antioxidantes e outras enzimas associadas, levando à diminuição do potencial antioxidante celular e por fim, (iv) modificando processos vitais essenciais, tais como a transcrição e tradução, de forma não direta, aumentando os níveis de ERO em estado estacionário (Lushchak et al., 2011).

A interação das ERO com os constituintes celulares pode levar a peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e danos oxidativos ao DNA (Sies, 1997). A peroxidação lipídica ou lipoperoxidação envolve a oxidação dos ácidos graxos polinsaturados existentes nos fosfolipídios das membranas celulares, sendo estes os locais mais susceptíveis às reações de oxidação. Entre os produtos finais formados durante o processo de lipoperoxidação, destacam-se gases de hidrocarbonetos e os aldeídos, como o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxinonenal (4-HNE) (Halliwell e Gutteridge, 2007). O 4-HNE em níveis elevados (acima de 1 μM) pode atuar em processos citotóxicos e genotóxicos, provocando danos mitocondriais e inibindo a ação de chaperonas, a síntese de DNA e de proteínas. Já o MDA pode atacar proteínas quando presente em ambientes de baixo pH, resultando em modificações de inúmeros resíduos de aminoácidos (especialmente lisina), também podendo

reagir com bases de DNA (especialmente guanina) gerando lesões mutagênicas (Halliwell e Gutteridge, 2007).

A lipoperoxidação pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultante da ação de radicais livres sobre os lipídeos insaturados das membranas celulares, gerando principalmente $L\cdot$, $LO\cdot$ e $LOO\cdot$ levando à destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de trocas de metabólitos e, numa condição extrema, à morte celular (Benzie, 1996). A lipoperoxidação talvez se constitua no evento citotóxico primário que desencadeia um sequência de lesões aos constituintes celulares. As alterações nas membranas levam a transtornos na permeabilidade, alterando o fluxo iônico e o fluxo de outras substâncias, o que resulta na perda da seletividade para entrada e/ou saída de nutrientes e substâncias tóxicas à célula, alterações do DNA, oxidação da LDL e comprometimento dos componentes da matriz celular (Baber e Harris, 1994).

A oxidação de proteínas pode ser reversível ou irreversível, dependendo do alvo e da forma de dano oxidativo. Devido a alta reatividade do $\cdot OH$, ele exerce mais efeitos nocivos a proteínas, enquanto que o H_2O_2 e $O_2^{\cdot -}$ ficam mais restritos aos ataques de grupos facilmente oxidáveis, como os grupamentos tiólicos. Todos os resíduos de aminoácidos podem ser oxidados por ERO, podendo também sofrer agregação e fragmentação, formando grupos carbonilas (Valko et al., 2006; Trachootham et al., 2008). Estudos sobre a oxidação de proteínas têm sido facilitados pela disponibilidade de um método simples e preciso, para quantificar a oxidação de proteína: o ensaio da dosagem de proteínas carboniladas. O ensaio detecta os grupos carbonila, por espectrofotômetro, após a sua reação com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (Levine et al., 1990). A dosagem de proteínas carboniladas em peixes pode fornecer informações úteis e ser utilizada como biomarcador de danos oxidativos decorrentes da exposição a contaminantes aquáticos.

1.1.3.4 Biomarcador de neurotoxicidade: Acetilcolinesterase

Com relação às funções neurais, a enzima de maior interesse como biomarcador em peixes é a acetilcolinesterase (AChE) (Van der Oost et al., 2003). A

acetilcolinesterase é uma enzima que é responsável pela hidrólise da acetilcolina (um éster neurotransmissor), tendo como produto o acetato e colina, com liberação de um próton (Romani et al., 2003). A hidrólise ocorre tão logo o neurotransmissor tenha cumprido seu papel, ou seja, ligar-se aos receptores da membrana pós sináptica permitindo a abertura de canais de íons Na^+ , e a consequente despolarização da membrana, o que irá proporcionar um potencial de ação, propagando o impulso (Stenesh, 1998). Este processo de hidrólise evita a propagação contínua do impulso nervoso, que pode acarretar efeitos comportamentais como hiperatividade, asfixia e morte (Roex, 2003).

A AChE é sensível a exposição a inseticidas organofosforados e carbamatos, sendo a dosagem de sua atividade frequentemente utilizada como biomarcador para a verificação dos efeitos primários da contaminação em diversos organismos, incluindo peixes, e na avaliação da qualidade das águas (Sancho et al., 2000; Lionetto et al., 2003). Estudos recentes demonstram que as acetilcolinesterases são também sensíveis a outros tipos de contaminantes ambientais como metais, detergentes, agrotóxicos a base de glifosato, além de misturas complexas de poluentes (Vale, 1998; Penã-Llopis et al., 2003; Ferrari et al., 2004; Monteiro et al., 2004; Modesto e Martinez, 2010a; Modesto e Martinez, 2010b).

Tendo em vista que organofosforados e carbamatos possuem tempo de meia-vida curto, a análise da inibição da AChE é uma ferramenta útil para avaliar seu efeito na biota aquática, mesmo quando os compostos químicos não são mais detectáveis no ambiente (Valbonesi et al, 2003).

1.1.3.5 Metalotioneínas

Outro biomarcador bioquímico importante na defesa do organismo à xenobióticos, especificamente a metais, são as metalotioneínas (MT). As metalotioneínas são proteínas citosólicas, de baixo peso molecular, e sua estrutura molecular é composta de uma única cadeia de aminoácidos dos quais 20 são cisteínas, que representam cerca de 30% do total de aminoácidos. Vários metais se ligam aos grupamentos tiol dos resíduos de cisteína, conferindo à metalotioneína grande afinidade por metais, e sua indução resulta de uma resposta específica de

exposição a metais como o cobre, zinco, cádmio e mercúrio (Engel e Roesijadi, 1987; Viarengo, 1989; Viarengo et al., 1997).

As funções biológicas de MT incluem homeostase de metais de importância fisiológica, como o cobre e o zinco, desintoxicação de metais essenciais e não essenciais e defesa antioxidante (Roesijadi, 1996; Viarengo et al., 2000). A possibilidade de que as MT podem atuar como antioxidante pode estar relacionada ao alto teor de grupamentos sulfidríla presentes nestas proteínas (Viarengo et al., 2000).

Espécies de peixes expostas a metais demonstraram aumento nos níveis de MT em experimentos voltados para analisar relações de dose-resposta (George, 1989; Hogstrand e Haux, 1991; Castaño et al., 1998) ou tempo-resposta (Beyer et al., 1997). A indução dessa proteína pode variar, dependendo das espécies e dos tecidos analisados (Roesijadi, 1996).

1.1.3.6 Biomarcadores genotóxicos

A exposição de um organismo a compostos xenobióticos pode ser também fator indutor de uma cascata de eventos sobre o DNA, levando a formação de alterações nesta macromolécula. A detecção e quantificação destas alterações podem ser empregadas como biomarcadores em organismos expostos a agrotóxicos no ambiente (Maroni, 2000). O DNA pode sofrer danos oxidativos, como oxidação e modificação das bases, e tanto as pirimidinas quanto as purinas podem ser afetadas. Adicionalmente, a mutagênese induzida por poluentes também pode ocorrer em virtude de modificações no DNA pela formação de aductos com o xenobiótico, seus metabólitos ou, ainda, com os produtos de peroxidação lipídica (Lackner, 1998).

A função primária dos testes de toxicologia genética é investigar, usando células ou organismos, o potencial de agentes químicos induzirem mutações nas células somáticas, ou que possam ser transmitidas às futuras gerações (da Silva et al., 2003).

O impacto de materiais tóxicos na integridade e no funcionamento do DNA da célula pode ser investigado em muitos organismos sob diferentes condições (McCarthy e Shugart, 1990). Dentre os principais testes podemos citar os de

avaliação da frequência de aberrações cromossômicas, troca de cromátides irmãs, formação de aductos com DNA, ensaio cometa (que avalia quebras no DNA) e avaliação da frequência de micronúcleo e outras anomalias nucleares (Bombail et al., 2001).

A detecção de quebras nas cadeias de DNA representa uma técnica valiosa da Ecotoxicologia, uma vez que tem revelado sensibilidade maior do que outros métodos comumente empregados na avaliação de danos no material genético (Lee e Steinert, 2003). O ensaio do cometa é extremamente sensível e bastante útil para a detecção de danos no DNA (Singh et al., 1988) e tem sido amplamente utilizado para avaliação de possíveis danos causados por contaminantes ambientais. Este método é bem adequado para o monitoramento *in situ* de peixes devido à sua facilidade, rapidez e baixo custo (Van der Oost et al., 2003).

Outro biomarcador genético bastante utilizado em peixes é o teste do micronúcleo (MN). O teste do micronúcleo tem sido aplicado extensivamente em testes de genotoxicidade de produtos químicos, pois estes são facilmente visualizados nos eritrócitos e são fortes indicativos para mensuração de aberrações cromossômicas (Campana et al, 2003). O princípio do teste baseia-se no fato de que, durante o processo de divisão celular, principalmente na anáfase, as cromátides e os fragmentos cromossômicos acêntricos não são transportados pelas fibras do fuso para os polos opostos, enquanto que os fragmentos com centrômero o são. Após a telófase, os cromossomos sem dano são incluídos no núcleo de cada uma das células filhas. No entanto, alguns elementos, normalmente muito pequenos, não são incluídos nos núcleos formados e permanecem no citoplasma, constituindo as estruturas caracterizadas como micronúcleos (Schmid, 1975).

Alterações morfológicas nos núcleos de eritrócitos de peixes também têm sido descritas na literatura (Hose et al., 1987). Carrasco et al. (1990) caracterizaram estas alterações como núcleos lobulados, núcleos segmentados, núcleos com constricção em formato de rim e núcleos vacuolizados. Sugere-se que as alterações eritrocíticas nucleares devem ser incluídas nas análises de genotoxicidade em peixes complementando a contagem de micronúcleo, por apresentar resultados mais confiáveis e mais completos (Ayllón e Garcia-Vazquez, 2001).

A utilização da laranja de acridina nos procedimentos de coloração é um método relativamente recente, visando aumentar a sensibilidade do teste do

micronúcleo. A laranja de acridina é capaz de se ligar ao DNA e RNA, que quando em fluorescência, apresentam cores amarelo-esverdeada e avermelhada, respectivamente, permitindo assim a diferenciação de eritrócitos imaturos (policromáticos) de eritrócitos maduros (normocromáticos) (Çavas e Gözükara, 2005). Outras vantagens desta coloração é a redução na contabilização de artefatos, maior rapidez no processo de análise, além de permitir a análise da taxa de renovação celular através da análise de eritrócitos imaturos (Polard et al., 2011).

No geral, os biomarcadores de danos no DNA são ferramentas valiosas para avaliar os efeitos da exposição aguda e crônica de organismos aquáticos às substâncias genotóxicas. Além disso, como genotoxinas podem induzir mudanças no DNA que são passadas para gerações futuras, este tipo de biomarcador pode ser usado de uma maneira preditiva, evitando consequências ecológicas irreversíveis.

1.1.4 Testes *In Situ* no Monitoramento Ambiental

Um dos métodos mais eficientes para monitorar os efeitos de misturas de contaminantes no ambiente é o confinamento *in situ* de espécies, como as de peixes (Barbee et al., 2008; Schlenk et al., 2008; Klobucar et al., 2010) pois integram maior relevância ecológica aos testes de toxicidade, uma vez que levam em consideração interações entre variáveis bióticas (por exemplo, interações multi-espécies), físicas (como intensidade de luz, velocidade do fluxo da água, temperatura) e químicas (pH, misturas de substâncias tóxicas), que não são consideradas em testes de laboratório (Bonnineau et al., 2012).

Testes *in situ* consistem no confinamento de organismos, como peixes e bivalves, em câmaras/gaiolas de exposição adaptadas, em condições ambientais reais, a fim de avaliar a bioacumulação e os efeitos de poluentes em escalas sub-individuais (Ferrari et al., 2013). Esses testes em peixes não são padronizados, e sua implementação é técnica e logisticamente mais exigente do que os bioensaios laboratoriais.

Essas ferramentas também oferecem a possibilidade de acompanhar variáveis ecologicamente relevantes que são difíceis de serem avaliadas em

métodos convencionais, como por exemplo, a taxa de crescimento de organismos frente a exposição à xenobióticos (Chappie e Burton, 2000; Crane et al., 2007). Por fim, estes testes permitem um refinamento nos métodos atuais de bioavaliação a nível sub-individual, permitindo prever os efeitos em nível de população e comunidade (Baird et al., 2007; Crane et al., 2007; Damasio et al., 2008).

1.1.5 Peixes como Organismos Biomonitorios

Organismos biomonitorios, ou organismos sentinela, são aqueles expostos à contaminação do ambiente, com a finalidade de obter respostas sobre a qualidade daquele local, e quando estas respostas são avaliadas periodicamente, caracteriza o biomonitoramento. Peixes são ideais para estudos toxicológicos, pois têm grande relevância ecológica, possuem ampla distribuição geográfica, são muito susceptíveis a estressores, pois, permanecem com o corpo todo em contato direto com os poluentes dissolvidos na água (Little et al., 1993). Desta forma, são tidos como bons biomonitorios de qualidade da água, além de ser um dos principais vetores de contaminantes para o ser humano (Al-Sabti e Metcalfe, 1995).

1.1.5.1 *Prochilodus lineatus*

O peixe *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Fig. 1.6) é conhecido popularmente como curimba, curimbatá, curimatã, corimbatá, papa-terra, dentre outros e é pertencente à família Prochilodontidae, que tem como características corpo de porte médio a grande, iliofagia (alimentam-se de detritos lamacentos), reofilia e grande capacidade migratória durante o período de sua piracema compreendida entre os meses de novembro a janeiro (Castro, 1990). Apresentam desova única por temporada com elevado número de óvulos, fecundação externa e ausência de cuidado parental (Lowe-McConnel, 1999). O gênero *Prochilodus* destaca-se por sua ampla distribuição na região Neotropical, podendo ser encontrado por toda América do Sul, bacias do rio Paraná, Grande, Uruguai, Amazonas, Orinoco, Magdalena, sendo considerada uma das espécies de peixe de água doce mais abundante e dispersa da América do Sul (Lowe-McConnel, 1999).

Figura 1.6 - Exemplar juvenil de *Prochilodus lineatus*.



Foto: LEFA/UEL.

De acordo com Shibata et al. (2007) *P. lineatus* é um peixe abundante na bacia do rio Tibagi, sendo a terceira espécie de maior ocorrência dentro da bacia hidrográfica. Outra característica da espécie é a grande sensibilidade a poluentes de naturezas diversas, verificada em exposições de laboratório aos metais chumbo (Monteiro et al., 2011), cobre (Nascimento et al., 2012) e alumínio (Camargo et al., 2009) e compostos orgânicos como os herbicidas glifosato (Langiano e Martinez, 2008) clomazone (Pereira et al., 2013), atrazina (Santos e Martinez, 2012; Paulino et al., 2012), endossulfan (Bacchetta et al., 2011) e derivados de petróleo como gasolina (Simonato et al., 2011) e diesel (Vanzela et al., 2007); como também em trabalhos de campo (Camargo e Martinez, 2006; Cazenave et al., 2009; Lombardi et al., 2010; Troncoso et al., 2012; Cazenave et al., 2014).

1.1.5.2 *Astyanax altiparanae*

Astyanax altiparanae (Garutti e Britski, 2000) (Fig. 1.7) é conhecido popularmente como lambari-do-rabo-amarelo. Os peixes dessa espécie são de pequeno porte (atingem cerca de 10 cm), prolíficos e servem de alimento para peixes carnívoros maiores. Apresentam grande flexibilidade alimentar, ingerindo principalmente insetos e sementes. Estudos de levantamento ictiofaunístico já constataram que os lambaris constituem um grupo muito frequente na bacia do rio Paraná. A espécie *A. altiparanae* distribui-se pela bacia do alto rio Tibagi (Shibatta et al., 2002), bacia do alto rio Iguaçu (Graça e Pavanelli, 2002) e em toda bacia do Paranapanema (Duke Energy, 2003). Caracteriza-se por apresentar o corpo

prateado, com a região ventral esbranquiçada e a região dorsal cinzenta, as nadadeiras caudal, anal e pélvicas são amareladas enquanto as demais são hialinas ou levemente amareladas. Na caudal, ainda, há uma faixa mediana negra estendida à extremidade dos raios medianos, separando os lobos superior e inferior. Acima da pupila, há uma mancha amarelo-ferrugem (Garutti & Britski, 2000). Contudo, como esta espécie ocorre numa grande diversidade de microambientes, as populações desse lambari não são homogêneas quanto à morfologia.

Fig. 1.7- Exemplar de *Astyanax altiparanae*.



Foto: o autor.

A espécie *A. altiparanae* apresenta uma alta diversidade genética intrapopulacional (Prioli et al., 2001). De acordo com Carvalho (1993), a diversidade genética, expressa dentro e entre as populações, pode favorecer a adaptação a um determinado habitat e também expandir a fronteira de colonização e de distribuição, permitindo a sobrevivência em uma ampla variedade de condições ambientais. A espécie exibe ainda grande versatilidade ecológica, com capacidade de ajuste a diversas situações ambientais e grande capacidade adaptativa exploratória, utilizando estratégias diferenciadas na estrutura populacional (Orsi et al., 2004).

A proposta da espécie *A. altiparanae* como organismo biomonitor no presente trabalho se dá pelo fato de ser esta uma espécie nativa, de ampla distribuição geográfica, importância ecológica, valor econômico, possuir grandes populações naturais e ser suficientemente sensível para detecção da toxicidade de xenobióticos.

Espécies do gênero *Astyanax*, têm sido apontadas como espécies sensíveis no monitoramento ambiental em vários trabalhos em campo (Schultz e Martins-Junior, 2000; Winkaler et al., 2001; Silva e Martinez, 2007; Lemos et al., 2008) e laboratório (Akaishi et al., 2004; Rossi et al., 2011).

1.2 OBJETIVOS

Geral

- ✓ Aplicar biomarcadores bioquímicos e genotóxicos em peixes residentes e expostos *in situ* para avaliar a qualidade da água em diferentes ribeirões de áreas agrícolas no norte do Paraná; e verificar os efeitos desta exposição sobre as respostas biológicas dos organismos.

Específicos:

- ✓ Avaliar efeitos bioquímicos e genotóxicos por meio de biomarcadores na espécie de peixe neotropical *Prochilodus lineatus* submetidos a testes *in situ* em ribeirões com diferentes níveis de preservação em áreas agrícolas no município de Londrina, PR, nos períodos de inverno e verão;
- ✓ Analisar as possíveis interferências de fatores sazonais, como a temperatura e pluviosidade nas respostas de biomarcadores frente à contaminação por agrotóxicos;
- ✓ Verificar a eficiência da abordagem de múltiplos biomarcadores integrados em um índice (Índice Integrado de Respostas de Biomarcadores v2) para avaliar e distinguir os níveis de contaminação em diferentes ribeirões de áreas agrícolas;
- ✓ Comparar a sensibilidade das respostas de biomarcadores em peixes da espécie *Astyanax altiparanae* expostos aguda (testes *in situ*) e cronicamente (residentes) a agrotóxicos em ambientes naturais;
- ✓ Verificar os efeitos da exposição a agrotóxicos em condições de campo sobre os parâmetros biológicos dos peixes;

- ✓ Identificar quais os biomarcadores nas duas espécies de peixe mais sensíveis para avaliação dos efeitos da contaminação por mistura de agrotóxicos.

1.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Sabti, K., Metcalfe, C.D. 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research–Genetic Toxicology*, 343, 121-135.
- Akaishi, F.M., Silva de Assis, H.C., Jakobi, S.C.G., Eiras-Stofella, D.R., St-Jean, S.D., Courtenay, S.C., Lima, E.F., Wagener, A.L R., Scofield, A.L., Ribeiro, C.A.O. 2004. Environmental contamination and morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax sp.*) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 46, 244-253.
- Almli, B., Egaas, E., Lode, O. 2002. Effects of three fungicides alone and in combination on glutathione S-transferase activity (GST) and cytochrome P-450 (CYP1A1) in the liver and gill of brown trout (*Salmo trutta*). *Marine Environmental Research*, 54, 237-240.
- ANVISA & UFPR. Seminário de mercado de agrotóxico e regulação. ANVISA, Brasília, 11 abril de 2012.
- Arzate-Cardenas, M.A., Martinez-Jeronimo, F. 2011. Age-altered susceptibility in hexavalent chromium-exposed *Daphnia schodleri* (Anomopoda: Daphniidae): integrated biomarker response implementation. *Aquatic Toxicology*, 105, 528–534.
- Ayllon, F., Garcia-Vazquez, E. 2001. Micronuclei and other nuclear lesions as genotoxicity indicators in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 49, 221-225.
- Bacchetta, C., Cazenave, J., Parma, M.J., 2011. Responses of biochemical markers in the fish *Prochilodus lineatus* exposed to a commercial formulation of endosulfan. *Water Air Soil Pollution*, 216, 39–49.

- Bagchi, D., Bagchi, M., Hassoun, E.A., Stohs, S.J. 1995. In vitro and in vivo generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. *Toxicology*, 104, 129–140.
- Baird, D.J., Brown, S.S., Lagadic, L. 2007. In situ-based effects measures: determining the ecological relevance of measured responses. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 3, 259–267.
- Balinova, A.M., Mondesky, M. J. 1999. Pesticide contamination of ground and surface water in Bulgarian Danube plain. *Environmental Science Health*, 33, 33-46
- Barbee, G.C., Barich, J., Duncan, B., Bickham, J.W., Matson, C.W., Hintze, C. J., Autenrieth, R.L., Zhou, G.D., McDonald, T.J., Cizmas, L., Norton, D., Donnelly, K.C. 2008. In situ biomonitoring of PAH-contaminated sediments using juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Ecotoxicology Environmental Safety* 71, 454 – 464.
- Barber, A.D., Harris, S.R. 1994. Oxygen free radicals and oxidants: a review. *American Pharmacy*, 34, 26-35.
- Beliaeff, B., Burgeot, T. 2002. Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology Chemistry*, 21, 1316–1322.
- Belluck, D.A., Benjamin, S.L., Dawson, T. 1991. Groundwater contamination by atrazine and its metabolites: risk assessment, policy and legal implications. In: Somasundaram, L., Coast, J.R. (eds). *Pesticides transformation products: fate and significance in the environment*. Washington, American Chemical Society, p. 254-273.
- Benzie, I.F.F. 1996. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 47, 233-261.
- Beyer, J., Sandvik, M., Skaare, J.U., Egaas, E., Hylland, K., Waagbø, R., Goksøyr, A. 1997. Time and dose-dependent biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus* L.) exposed to benzo[a]pyrene, 2,3,3',4,4',5-hexachlorobiphenyl (PCB-156) and cadmium. *Biomarkers*, 2, 35-44.

- Bombail, V., AW, D., Gordon, E., Batty, J. 2001. Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. *Chemosphere*, 44, 383-392.
- Bonnineau, C., Moeller, A., Barata, C., Proia, L., Sans-Piché, F., Schmitt-Jansen, M., Guasch, H., H, Segner. 2012. In: Guasch, H., Ginebreda, A., Geiszinger, A. (Eds) *Advances in the Multibiomarker Approach for Risk Assessment in Aquatic Ecosystems. The Handbook of Environmental Chemistry- Emergency and Priority Pollutants in Rivers*. Berlim, Springer, pp.147-179.
- BRASIL, Decreto n.º 4.074 de 04 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei nº 7.802/89 (lei federal dos agrotóxicos). Brasília, Diário Oficial da União de 08/01/2002.
- BRASIL, Lei n.º 7.802, de 12 de julho de 1989. “lei federal dos agrotóxicos”. Brasília, Diário Oficial da União de 12/07/1989.
- Brethead, S., Toutant, J.P., Saglio, P. 2000. Effects of Carbofuran, Diuron and Nicossulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 47, 117-124.
- Bucheli, T.D., Fent, K. 1995. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Critical Reviews Environmental Science Technology*, 25, 201-268.
- Cajaraville, M.P., Bebianno, M.J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A. 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Science Total Environmental*, 247, 295-311.
- Caldas, E., Souza, L.C. 2000. Avaliação de risco crônico da ingestão de resíduos de agrotóxicos da dieta brasileira. *Revista Brasileira de Saúde*, 34, 529-537.
- Camargo, M.M.P., Fernandes, M.N., Martinez, C.B. 2009. How aluminium exposure promotes osmoregulatory disturbances in the neotropical freshwater fish *Prochilus lineatus*. *Aquatic Toxicology*, 94, 40-46.
- Camargo, M.M.P., Martinez, C.B.R., 2006. Biochemical and physiological biomarkers in *Prochilodus lineatus* submitted to in situ tests in an urban stream in southern Brazil. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 21, 61–69.
- Campana, M.A. 2003. Micronuclei induction in *Rana catesbeiana* by the Pyrethroid insecticide lambda-Cyhalothrin. *Genetics and Molecular Biology*, 26, 99-103.

- Carrasco, K.R., Tilbury, K.L., Myers, M.S. 1990. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 47, 2123 -2136.
- Carvalho, G.R. 1993. Evolutionary aspects of fish distribution: Genetic variability and adaptation. *Journal of Fish Biology*, 43, 53-73.
- Castaño, A., Carbonelli, G., Carballo, M., Fernandez, C., Boleas, S., Tarazona, J.V. 1998. Sublethal effects of repeated intraperitoneal cadmium injections on rainbow trout (*Oncorhynchus-mykiss*). *Ecotoxicology Environmental*, 41, 29-35.
- Castro, R.M.C. 1990. Revisão taxonômica da família Prochilodontidae (*Ostriophysi, Characiformes*). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Brasil.
- Cattaneo, R., Clasen, B., Loro, V.L., Spanevello, R., Silveira, F.A., Luz, L., Miron, D.S., Fonseca, M.B., Clasen, B. 2008. Metabolic and histological parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to commercial formulation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) herbicide. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 92, 133-137.
- Çavas, T., Ergene-Gözükara, S. 2005. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquatic Toxicology*, 74, 264-271.
- Cazenave, J., Bacchetta, C., Parma, M.J., Scarabotti, P.A., Wunderlin, D.A. 2009. Multiple biomarkers responses in *Prochilodus lineatus* allowed assessing changes in the water quality of Salado River basin (Santa Fe, Argentina). *Environmental Pollution*, 157, 3025–3033.
- Cazenave, J., Bacchetta, C., Rossi, A., Ale, A., Campana, M., Parma, M.J. 2014. Deleterious effects of wastewater on the health status of fish: A field caging study. *Ecological Indicators*, 38, 104-112.
- Chappie, D.J., Burton, A.G. 2000. Applications of aquatic and sediment toxicity testing in situ . *Soil and Sediment Contamination*, 9, 219–245.
- Contardo-Jara, V., Klingelmann, E., Wiegand, C. 2009. Bioaccumulation of glyphosate and its formulation Roundup ultra in *Lumbriculus variegatus* and its effects on biotransformation and antioxidant enzymes. *Environmental Pollution*, 157, 57-63.

- Crane, M., Burton, G.A., Culp, J.M. 2007. Review of aquatic in situ approaches for stressor and effect diagnosis. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 3, 234–245.
- Da Silva, J., Heuser, V., Andrade, V. 2003. Biomonitoramento Ambiental. In: da Silva, J., Erdtmann, B., Henriques, J.A.P. *Genética Toxicológica*. Porto Alegre, Alcance, pp.167-178.
- Damasio, J., Tauler, R., Teixido, E. 2008. Combined use of *Daphnia magna* in situ bioassays, biomarkers and biological indices to diagnose and identify environmental pressures on invertebrate communities in two Mediterranean urbanized and industrialized rivers. *Aquatic Toxicology*, 87,310–320.
- DeLeve, L.D., Kaplowitz, N. 1991. Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacology & Therapeutics*, 52, 287–305.
- Depledge, M. H.,Aagaard, A., P. Gyorkost. 1995. Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioral biomarkers. *Marine Pollution Bulletin*, 31, 19-27.
- Di Giulio, R.T., Benson, W.H., Sanders, B.M., Van Veld, P.A. 1995. Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation, and toxicity. In: RAND, G.M. (ed.) *Fundamentals of aquatic toxicology*. Taylor & Francis DC, Washington, p. 523-561.
- Dixon, D., Laphorn, P.A. Plant glutathione transferases.2002. *Genome Biology*, 3, 1-10.
- Dores, E.F.G.C., De-Lamonica-Freire, E.M. 2001. Aquatic environment contamination by pesticides. Case study: water used for human consumption in Primavera do Leste, Mato Grosso. *Química Nova*, 24, 27-36.
- Duke Energy–Geração Paranapanema. 2003. *Peixes do rio Paranapanema*. São Paulo. Ed. Horizonte Geográfico, 112p.
- Eichelberger, J.W., Lichtenberg, J.J. 1971. Persistence of pesticides in river water. *Environmental Science and Technology*, 5, 541-544.
- Engel, D.W., Roesijadi, G. 1987. Metallothioneins: a monitoring tool. In: Vernberg, V.B., Calabrese, A., Thurberg, F.P., Vernberg, F.J, (ed). *Pollution physiology of estuarine organisms*. Academic Press, New York, pp. 421-437.
- Ferrari, A., Venturino, A., D`angelo, A.M.P. 2004. Time course of brain cholinesterase inhibition and recovery following acute and subacute

- azinthosmethyl, parathion and carbaryl exposure in the goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 57, 420-425.
- Ferrari, B.J.D.; Geffard, O. Chaumot, A. 2013. In situ bioassays in Ecotoxicology. In: Féraud, J., Claise, C. (eds) *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*. Springer, Berlin, pp.635-641.
- Garutti, V., Britski, H.A. 2000. Descrição de uma nova espécie de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) na bacia do alto do rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero da bacia. *Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia, Série Zoologia*, 13, 65-88.
- George, S.G. 1989. Cadmium effects on plaice liver xenobiotic and metal detoxication systems: dose response. *Aquatic Toxicology*, 15, 303-310.
- Gluszczak, L., Miron, D.S., Crestani, M., Fonseca, M.B, Pedron, F.A., Duarte, M.F., Vieira, V.L. 2006. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Ecotoxicology Environmental Safety*, 65, 237-241.
- Goksoyr, A., Forlin, L. 1992. The cytochrome P450 system in fish. *Aquatic toxicology and environmental monitoring*. *Aquatic Toxicology*, 22, 287-312.
- Graça, W.J., Pavanelli, C.S. 2002. *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Osteichthyes, Characidae) in the Iguaçu River basin. *Acta Scientiarum*, 24, 451-453.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4th ed. Oxford University Press, Oxford, 888p.
- Higashi, K. 1991. São Paulo. Relatório do XV Encontro Nacional de Analistas de Resíduos de Pesticidas.
- Hodgson, E., Das P.C., Cho, T.M., Rose, R.L. 2008. Phase I Metabolism of Toxicants and Metabolic Interactions. In: Smart, R.C., Hodgson, E. (ed) *Molecular and Biochemical Toxicology* 4th ed. John Wiley & Sons, New Jersey, pp.173-204.
- Hodgson, E., Goldstein, J.A. 2001. Metabolism of toxicants: phase I reactions and pharmacogenetics. In: Hodgson, E., Smart, R.C. (ed) *Introduction to biochemical toxicology*. 3rd ed. New York, Wiley-Interscience, pp.67-113.
- Hogstrand, C., Haux, C. 1991. Binding and detoxification of heavy metals in lower vertebrates with reference to metallothionein. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 100, 137-141.

- Hose, J.E., Cross, J., Smith, S.G., Diehl, D. 1987. Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminated sites off Southern California. *Marine Environmental Research*, 22, 167-176.
- Huggett, R.J., Kimerie, R.A., Mehrie Jr., P.M., Bergman, H.L. 1992. *Biomarkers: biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress*. Lewis Publishers, Boca Raton, 347p.
- IPARDES- Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social. Paraná estabiliza perda de mata nativa e avança em gestão ambiental. 2010. Disponível em: <http://www.ipardes.pr.gov.br/modules/noticias/article>. Acesso em: 06 ago. 2012.
- Janz, D. M. 2013. Biomarkers in Fish Ecotoxicology. In: Féraud, J. & C. Claise (ed) *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*. Berlin, Springer, pp. 211-220.
- Jobling, M. 1995. *Environmental Biology of Fishes*. Fish and Fisheries Series, Chapman & Hall, London. pp. 211-249.
- Kleinow, K.M., Melancon, M.J., Lech, J.J. 1987. Biotransformation and induction: implications for toxicity, bioaccumulation and monitoring of environmental xenobiotics in fish. *Environmental Health Perspectives*, 71, 105-119.
- Klobucar, G.I.V., Stambuk, A., Pavlica, M., Peric, M.S., Hackenberger, B.K., Hylland, K. 2010. Genotoxicity monitoring of fresh water environments using caged carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology*, 19, 77-84.
- Lackner, R. 1998. "Oxidative stress" in fish by environmental pollutants. In: Braunbeck, T.; Hinton, D.E.; Streit, B. (ed). *Fish ecotoxicology*. Basel, Switzerland, Birkhäuser Verlag, p. 203-224.
- Langiano, V.do C., Martinez, C.B.R. 2008. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology*, 147, 222-231.
- Lee, R.F., Steinert, S. 2003. Use of the single-cell gel electrophoresis comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research*, 544, 43-64.
- Lemos, C.T., Iranço, F.A., Oliveira, N.C.D., Souza, G.D., Fachel, J.M.G. 2008. Biomonitoring of genotoxicity using micronuclei assay in native population of *Astyanax jacuhiensis* (Characiformes: Characidae) at sites under petrochemical influence. *Science of the Total Environment*, 406, 337-343.

- Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, B.W., Shaltiel, S., Stadtman, E.R. 1990 Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, 186, 464–478.
- Lionetto, M.G., Caricatto, R., Giordano, M.E., Pascariello, M.F., Marinosci, L., Schettino, T. 2003. Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Pollution Bulletin*, 46, 324–330.
- Little, E. E., Brewer, S. K., 2001. Neurobehavioral toxicity in fish. Schlenk, D. and Benson, W.H. (Ed.), *Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleost New Perspectives: Toxicology and the Environment*, Taylor and Francis, London and New York. 2, 139-174.
- Lombardi, P.E., Peri, S.I., Verrengia Guerrero, N.R. 2010. Trace metal levels in *Prochilodus lineatus* collected from the La Plata River, Argentina. *Water Air Soil Pollution*, 160, 47–59.
- Lowe McConnell, R.H. 1999. *Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais*, São Paulo, Edusp, 535.
- Lushchak, V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, 101, 13–30.
- Marin, M., Morales, A., Colell, A., Garcia-Ruiz, C., Fernandez-Checa, J.C. 2009. Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. *Antioxidants and redox signaling*, 11, 2685-700.
- Maroni, M. 2000. Biological Monitoring of Pesticide Exposure: a review, Introduction. *Toxicology*, 143, 1-118.
- McCarthy, J. F.; Shugart, L.R. 1990. Biomarkers of environmental contamination. Lewis, Boca Raton. Meister, A. 1994. Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *The Journal of Biological Chemistry*, 269, 9397-9400.
- Modesto, K.A., Martinez, C.B.R. 2010a. Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere*, 81, 781–787.
- Modesto, K.A., Martinez, C.B.R. 2010b. Roundup causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere*, 78, 294-299.

- Monteiro, M., Quintaneiro, C., Morgado, F., Soares, A.M.V.M., Guilhermino, L. 2004. Characterization of the cholinesterases present in the head tissues of the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: Application to biomonitoring. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 62, 341-347.
- Monteiro, V., Cavalcante, D. G., Viléla, M. B., Sofia, S. H., Martinez, C. B., 2011. In vivo and in vitro exposures for the evaluation of the genotoxic effects of lead on the Neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Aquatic Toxicology*, 104, 291-298.
- Mouneyrac, C., C. Amiard-Triquet. 2013. Biomarkers of ecological relevance. In: Férard, J. & C. Claise (ed) *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*. Springer, Berlin, p. 210-219.
- Nascimento, C.R., Souza, M.M., Martinez, C.B. 2012. Copper and the herbicide atrazine impair the stress response of the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Toxicology & Pharmacology: CBP*, 155, 456-461.
- Orsi, M.L., Carvalho, E.D., Foresti, F. 2004. Biologia populacional de *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski (Teleostei, Characidae) do médio rio Paranapanema, Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 21, 207-218.
- Paulino, M. G., Souza, N.E.S., Fernandes, M.N. 2012. Subchronic exposure to atrazine induces biochemical and histopathological changes in the gills of a Neotropical freshwater fish, *Prochilodus lineatus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 80, 6-13.
- Peña-Llopis, S., Ferrando, M.D., Peña, J.B. 2003. Fish tolerance to organophosphate- induced oxidative stress is dependent on the glutathione metabolism and enhanced by N- acetylcysteine. *Aquatic Toxicology*, 65, 337-360.
- Pereira, L., Fernandes, M.N., Martinez, C. B., 2013. Hematological and biochemical alterations in the fish *Prochilodus lineatus* caused by the herbicide clomazone. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 6, 1-8.
- Polard, T., Jean, S., Merlina, G. 2011. Giemsa versus acridine orange staining in the fish micronucleus assay and validation for use in water quality monitoring. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74, n. 1, 144-9.

- Pollack, N., Cunningham, A.R., Rosenkrantz, H.S. 2003. Environmental persistence of chemicals and their carcinogenic risks to human. *Mutation Research*, 528, 81–91.
- Prioli, S.M.A.P. 2001. Relações genéticas e filogenéticas entre espécies do gênero *Astyanax* do rio Iguaçu, analisados por marcadores de DNA mitocondrial e RAPD. Tese (Doutorado)- Universidade Estadual de Maringá.
- Rand, G.M., Wells, P.G., McCarty, L.S. 1995. Introduction to Aquatic Toxicology. In: Rand, G.M (ed) *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Washington, Taylor & Francis, pp.3-70.
- Regoli, F., Gorbi, S., Frenzilli, G., Nigro, M., Corsi, I., Focardi, S., Winston, G.W. 2002a. Oxidative stress in ecotoxicology: from the analysis of individual antioxidants to a more integrated approach. *Marine Environmental Research*, 54, 419-423.
- Regoli, F., Pellegrini, D., Winston, G.W., Gorbi, S., GiulianI, S., Virno-Lamberti, C., Bompadre, S. 2002b. Application of biomarkers for assessing the biological impact of dredged materials in the Mediterranean: the relationship between antioxidant responses and susceptibility to oxidative stress in the red mullet (*Mullus barbatus*). *Marine Pollution Bulletin*, 44,912-22.
- Reischl, E., Dafre, A.L., Franco, J.L., Wilhelm-Filho, D. 2007. Distribution, adaptation and physiological meaning of thiols from vertebrate hemoglobins. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 146,22-53.
- Roesijadi, G., 1996. Metallothionein and its role in toxic metal regulation. *Comparative Biochemistry and Physiology C, Comparative Pharmacology and Toxicology*. 113, 117– 123.
- Roex, E.W.M., Keijzers, R., Van-Gestel, C.A.M. 2003. Acetylcholinesterase inhibition and increased food consumption rate in the zebrafish *Danio rerio*, after chronic exposure to parathion. *Aquatic Toxicology*, 64, 451-460.
- Romani, R., Antognelli, C., Baldracchini, F., de Santis, A., Isani, G.,GiovanninI, E., Rosi, G. 2003. Increased acetylcholinesterase activities in specimens of *Sparus auratus* exposed to sublethal copper concentrations. *Chemico-Biological Interactions*, 145, 321-329.

- Rossi, S.C., Silva, M.D., Piancini, L.D., Ribeiro, C.A.O., Cestari, M.M., Assis, H.C.S. 2011. Sublethal Effects of Waterborne Herbicides in Tropical Freshwater Fish. *Bulletin Environmental Contamination Toxicology*, 87, 603-607.
- Sanchez, W., Burgeot T., Perceval, O. 2011. Perspectives from the French workshop on the development and validation of biomarkers and bioassays for the monitoring of aquatic environments. *Environmental Science Pollution Research*, 19, 1345–1347.
- Sanchez, W., Burgeot, T., Porcher, J. 2013. A novel “Integrated Biomarker Response” calculation based on reference deviation concept. *Environmental Science Pollution Research*, 20, 2721-2725.
- Sancho, E., Cerón, J.J., Ferrando, M.D. 2000. Cholinesterase Activity and Hematological Parameters as Biomarkers of Sublethal Molinate Exposure in *Anguilla anguilla*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 46,81-86.
- Santos, T.G., Martinez, C.B.R. 2012. Atrazine promotes biochemical changes and DNA damage in a Neotropical fish species. *Chemosphere*, 89, 1118-1125.
- Schlenk, D., Handy, R., Steinert S., Depledge, M., Benson, W. 2008. Biomarkers. In: Di Giulio, R.T., Hinton D.E. (ed). *The Toxicology of Fishes*. CRC Press, New York, pp. 683-715.
- Schmid, W. 1975. The micronucleus test. *Mutation Research*, 31, 9-15.
- Schultz, U.H., Martins-Junior, H. 2000. *Astyanax fasciatus* as bioindicator of water pollution of Rio dos Sinos, RS, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 61: 615–622.
- Serafim, A., Company, R., Lopes, B., Fonseca, V. F., França, S., Vasconcelos, R. P., Bebianno, M. J. & Cabral, H. N. 2012. Application of an integrated biomarker response index (IBR) to assess temporal variation of environmental quality in two Portuguese aquatic systems. *Ecological Indicators*, 19: 215-225.
- Shibata, O. A., Gealh, A. M., Bennemann, S. T., 2007. Ictiofauna de trechos alto e médio da bacia do rio Tibagi, Paraná, Brasil. *Biota Neotropica*, 2, 125-134.
- Shibatta, O.A., Orsi, M.L., Bennemann, S. T., Silva-Souza, A. T. 2002. Diversidade e distribuição de peixes na bacia do rio Tibagi. In: Medri, M.E., Bianchini, E., Shibatta, O.A., Pimenta, J.A. *A bacia do rio Tibagi*. M.E, Londrina.
- Sies, H.1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, 82,291-295.

- Silva, A.G., Martinez, C.B.R. 2007. Morphological changes in the kidney of a fish living in an urban stream. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 23,185-192.
- Simonato, J.D., Fernandes, M.N., Martinez, C.B. 2011. Gasoline effects on biotransformation and antioxidant defenses of the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Ecotoxicology*, 20, 1400-1410.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L.A.1988. Single technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175, 184–191.
- Solomon, K.R., Dalhoff, C., Volz, D., Van der Kraak. 2014. Effects of herbicides on fish. In: Tierney, K.B., Farrell, A.P., Brauner, C;J. (ed). *Organic Chemical Toxicology of Fishes*. Elsevier, London, p.370-409.
- Solomon, K.R.; Baker, D. B.; Richards, R. P.; Kenneth, R.D.; Klaine, S. J.; Lapoint, T. W.; Kendall, R.J.; Weisskopf, C. P.; Giddings, J. M.; Giesy, J. P.; Hall Jr, L. W.; Williams,W. M.; 1996. Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15, 31-76.
- Stegeman, J.J., Hahn, M., 1994. Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: current perspectives on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. In: Malins, D.C., Ostrander, G.K. (ed), *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives*. CRC Press, Boca Baton, pp. 87–206.
- Stegeman, J.J., Brouwer, M., Di Giulio, R.T.; Förlin, L., Fowler, B.A., Sanders, B.M., Van Veld, P.A. 1992. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: Hugget, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle Jr, P.M., Bergman, H.L. (ed) *Biomarkers. Biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress*. Lewis Publishers, Boca Raton, p. 235-335.
- Stenesh, J. *Biochemistry*. 1998.Plenum. New York, 596p.
- Trachootham, D., LU, W., Ogasawara, M.A., Nilsa, R.D., Huang, P.2008 Redox regulation of cell survival. *Antioxidants and Redox Signaling*, 10, 1343-74.
- Troncoso, I.C., Cazenave, J., Bacchetta, C., Bistoni, M.A. 2012. Histopathological changes in the gills and liver of *Prochilodus lineatus* from the Salado River basin (Santa Fe, Argentina). *Fish Physiologyand Biochemistry*, 38, 693–702.

- Valbonesi, P., Sartor, G., Fabbri, R. 2003. Characterization of cholinesterase activity in three bivalves inhabiting the North Adriatic Sea and their possible use as sentinel organisms for biosurveillance programmes. *The Science of Total Environment*, 312, 79-88.
- Vale, J.A. 1998. Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP) insecticide poisoning. *Toxicology Letters*, 102, 649-652.
- Valko, M., Rhodes, C.J., MoncoL, J., Izakovic, M., Mazur, M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160, 1-40.
- Van Der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13, 57–149.
- Vanzella, T.P., Martinez, C.B.R., Cólus, I.M.S. 2007. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. *Mutation Research*, 631, 36-43.
- Viarengo, A. 1989. Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. *Aquatic Science*, 1, 295–317.
- Viarengo, A., Burlando, B., Ceratto, N., Panfoli, I. 2000. Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. *Cellular and Molecular Biology*, 46, 407-417.
- Viarengo, A., Ponzano, E., Dondero, F., Fabbri, F. 1997. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: a application to Mediterranean and Antarctic mollusks. *Marine Environmental Research*, 44, 69-84.
- Walker, C.H., Hopkin, S.P., Sibly, R.M., Peakall, D.B. 1996. *Principles of ecotoxicology*. London, Taylor & Francis.
- Winkaler, E.U., Silva, A.G., Galindo, H.C., Martinez, C.B.R. 2001. Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná. *Acta Scientiarum*, 23: 507–514.
- Yu, B.P.1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews*,74, 139-16.

CAPÍTULO II

Manuscrito em preparação para ser submetido ao periódico Chemosphere

Respostas de múltiplos biomarcadores em *Prochilodus lineatus* expostos *in situ* para avaliação da contaminação aquática em áreas agrícolas

RESUMO

A região norte do estado o Paraná se destaca no cenário de produtividade agrícola brasileiro, tendo como consequência a intensiva utilização de agrotóxicos, que podem ter reflexos negativos sobre as comunidades aquáticas. Neste contexto, o principal objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade dos ribeirões Apertados (AP), Jacutinga (JC) e Godoy (GD), pertencentes à bacia do rio Tibagi, e verificar a influência de fatores sazonais, como a pluviosidade e a temperatura, sobre as respostas biológicas dos organismos. Para tanto, foi utilizada a espécie de peixe neotropical *Prochilodus lineatus*, que foi submetida à testes *in situ*, por um período de exposição de 96 h nestes ribeirões. Parâmetros bioquímicos, tais como as enzimas de biotransformação 7-etoxiresorufina-O-desetilase (EROD) e glutational-S-transferase (GST), tióis não protéicos (NPSH), lipoperoxidação (LPO), carbonilação de proteínas (PCO), acetilcolinesterase (AChE) e proteínas semelhantes à metalotioneínas (PSMT), foram avaliados em diferentes órgãos dos peixes, além dos biomarcadores genotóxicos (danos no DNA e a ocorrência de micronúcleo e alterações nucleares) analisados em eritrócitos. Os resultados mostraram que os ribeirões AP e JC são os mais afetados pelas atividades agrícolas, fato este confirmado pelos maiores valores do Índice Integrado de Resposta de Biomarcadores (IBR) e análises químicas de agrotóxicos nestes ribeirões. Não surpreendente, o ribeirão Godoy, localizado dentro de um fragmento florestal ao lado de unidade de conservação (UC), apresentou um menor grau de contaminação, visto que os valores de IBR e análises químicas indicaram níveis menos elevados dos contaminantes encontrados, provavelmente relacionado a um efeito protetor da vegetação à entrada de agrotóxicos. Entretanto, variações importantes observadas em alguns parâmetros avaliados nos peixes confinados neste local ainda sim indicam os efeitos de agrotóxicos presentes no ambiente, que podem estar chegando via atmosférica ou subterrânea. Os biomarcadores mais consistentes foram os biomarcadores de efeito, como danos oxidativos – lipoperoxidação (LPO), danos genotóxicos (teste do cometa) e neurotóxicos (atividade da AChE). Os biomarcadores de exposição, tais como a atividade da GST, e o conteúdo de NPSH apresentaram variações importantes entre as duas épocas do ano, que podem estar mais relacionadas com as variações sazonais (temperatura, pluviosidade, diluição, movimentação de sedimentos).

Palavras-chave: biomonitoramento, estresse oxidativo, biotransformação, genotoxicidade, agrotóxicos.

2.1 INTRODUÇÃO

A necessidade de aumento na produção de alimentos tem resultado na crescente utilização de fertilizantes e agrotóxicos, que entram nos ambientes aquáticos a partir das áreas de aplicação, reduzindo a qualidade da água e promovendo diferentes efeitos sobre os organismos nativos. O Brasil é o maior consumidor mundial de agrotóxicos, sendo que apenas entre os anos de 2010 e 2011 foram utilizadas aproximadamente 853 milhões de litros em todo o território natural (ANVISA e UFPR, 2012). Defensivos agrícolas desempenham papéis benéficos preservando a produtividade das culturas, embora possam representar sérias preocupações com o meio ambiente e os seres humanos em virtude de seu uso/mau uso intensivo e generalizado, relacionado a aplicações negligentes e de alta repetibilidade e derrames acidentais.

Embora as análises quantitativas e qualitativas de compostos químicos nos ecossistemas aquáticos sejam de grande relevância, as mesmas por si só não são capazes de revelar os potenciais efeitos de misturas complexas de contaminantes químicos sobre a biota aquática (Kerambrun et al., 2011). Neste contexto, os métodos alternativos de monitoramento ambiental, envolvendo biomarcadores têm sido desenvolvidos, buscando-se fornecer uma avaliação confiável da qualidade do ambiente (Van der Oost et al., 1996).

Com o objetivo de detectar precocemente a poluição ambiental, prevenir seus efeitos sobre os organismos e subsidiar ações de manejo, inúmeros estudos têm sido desenvolvidos e diversas estratégias no monitoramento têm sido empregadas (Zagatto, 2006). Uma vez que tais estudos visam manter a integridade e qualidade dos ecossistemas, se torna fundamental a compreensão das interações entre os contaminantes e os organismos (Bortone, 2005). Dentre os parâmetros avaliados nestes organismos estão a concentração química do contaminante em determinado tecido e os efeitos biológicos do contaminante. Estes efeitos biológicos são chamados de biomarcadores, que são definidos como variações induzidas por agentes tóxicos em componentes moleculares ou celulares, processos, estruturas e funções, determináveis em sistemas biológicos ou amostras (Depledge, 1995). A sua principal característica é o potencial de antecipar prejuízos em níveis superiores

de organização biológica, sendo, portanto, utilizados de forma preventiva, antes que distúrbios ecológicos ocorram (Mouneyrac e Amiard-Triquet, 2013).

No entanto, não existe um único biomarcador que possa dar um diagnóstico completo dos efeitos da exposição dos organismos a contaminantes ambientais. Sendo assim, o uso de uma bateria de biomarcadores complementares é recomendado para obter uma maior compreensão do modo como os organismos respondem frente à poluição de uma determinada área (Lavado et al., 2006; Cazenave et al., 2009).

Um dos métodos mais eficientes para monitorar os efeitos de misturas de contaminantes no ambiente é o confinamento *in situ* de espécies, como as de peixes (Schlenk et al., 2008; Klobucar et al., 2010). Os testes *in situ* integram maior relevância ecológica em relação aos testes de toxicidade em laboratório, uma vez que levam em consideração interações entre variáveis bióticas (por exemplo, interações multi-espécies), físicas (como intensidade de luz, velocidade do fluxo da água) e químicas (misturas de substâncias tóxicas) (Bonnineau et al., 2012). Além disso, o biomonitoramento ativo usando gaiolas oferece várias vantagens: o conhecimento preciso do lugar e a duração exata da exposição e a seleção de espécies com a biologia e estágios de desenvolvimento específicos (constância do organismo-teste) (Oikari, 2006). Desta forma, os resultados de diferentes locais são validamente comparáveis.

No presente trabalho, a espécie *Prochilodus lineatus* foi selecionada como organismo biomonitor, sendo um representante de peixe neotropical presente nos corpos d'água da região do presente estudo; com relevância ecológica e importância econômica que apresenta respostas rápidas frente à exposição a vários poluentes, tanto em estudos de laboratório (Parma et al., 2007; Langiano e Martinez, 2008; Simonato et al., 2011; Bacchetta et al., 2011; Paulino et al., 2012) quanto em campo (Camargo e Martinez, 2006; Cazenave et al., 2009; Lombardi et al., 2010; Troncoso et al., 2012; Cazenave et al., 2014).

A região norte do Paraná tem se destacado no cenário agrícola do estado como uma das regiões de maior produtividade. O intensivo uso de agrotóxicos, aliado a redução da cobertura vegetal, faz com os corpos hídricos localizados nesta região tornem-se ambientes ainda mais suscetíveis à contaminação química oriunda das atividades agrícolas. Desta forma, buscou-se com este trabalho aplicar

biomarcadores bioquímicos e genotóxicos no peixe *P. lineatus* submetidos a testes *in situ*, para avaliar a qualidade ambiental de três ribeirões que fazem parte da bacia do rio Tibagi- os ribeirões Apertados, Jacutinga e Godoy, como também verificar a interferência de variações sazonais nas respostas biológicas dos animais. A fim de obter uma visão mais holística e integrada da qualidade dos ambientes, os biomarcadores selecionados neste trabalho foram aplicados em um índice de análise integrada, chamado "Índice Integrado de Resposta de Biomarcadores" (IBRv2) proposto por Sanchez et al. (2013) que permite representar de forma mais simples a qualidade dos ambientes a serem investigados.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Área de Estudo

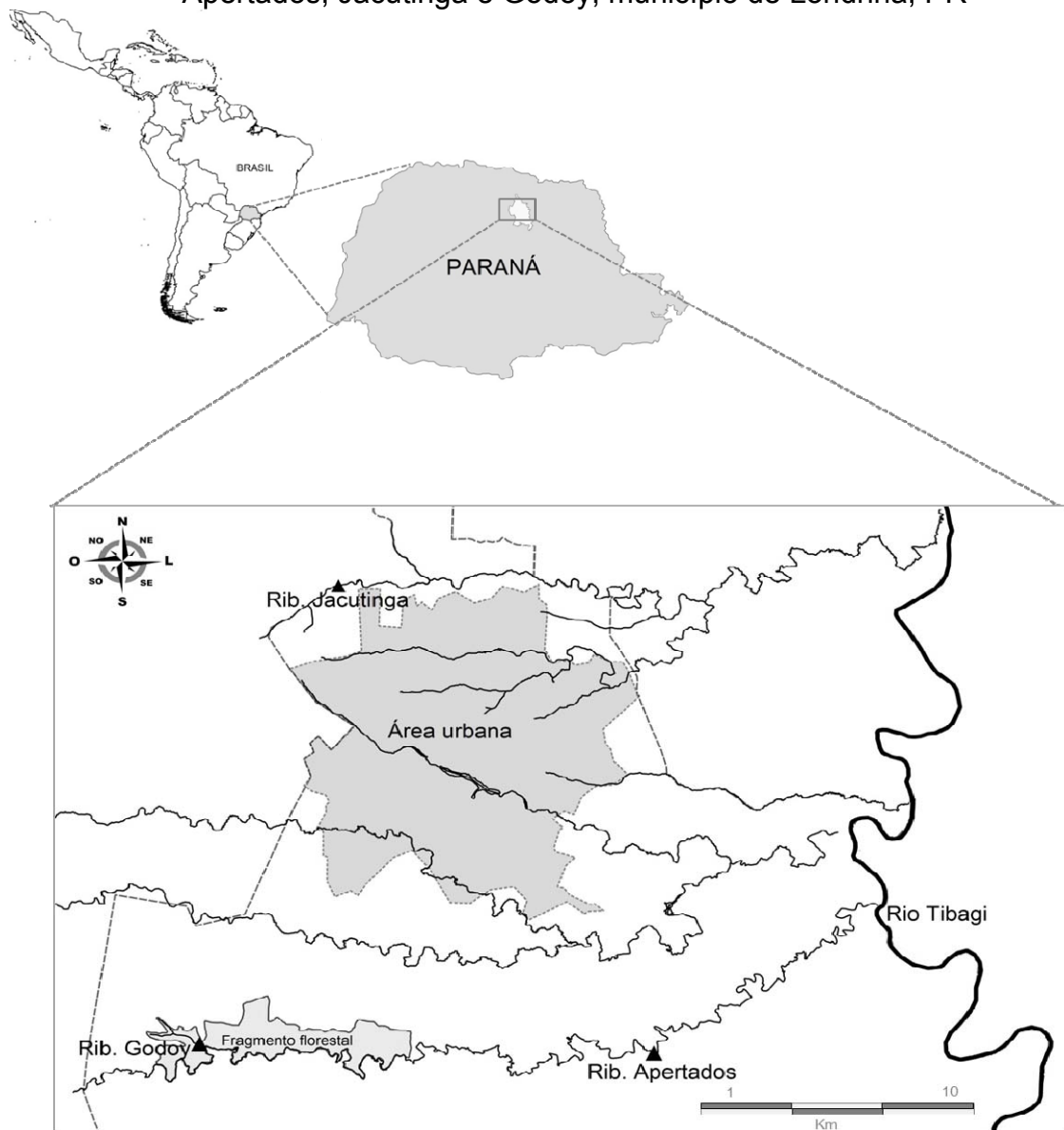
Os ribeirões avaliados neste trabalho são afluentes do trecho baixo do rio Tibagi (Fig.2.1). Localizados em áreas rurais do município de Londrina, PR, caracterizadas pelo desmatamento e implantação de grandes monoculturas com intensa utilização de agrotóxicos, estes ribeirões foram escolhidos devido as suas condições ambientais, brevemente descritas a seguir e que indicam uma distinção dos mesmos com relação ao grau de conservação. Além disso, constituem fontes de recursos pesqueiros para as populações rurais.

Ribeirão Godoy (GD): Este pequeno corpo d'água sem nome é encontrado dentro de um fragmento florestal adjacente ao Parque Estadual Mata dos Godoy, sendo assim chamado neste trabalho de ribeirão Godoy. Os testes foram realizados em local bem preservado (23°27'18,7"S–51°16'33,8"W) e apresentando vegetação nativa por toda sua extensão. Apresenta águas rasas, com fluxo rápido e substrato argilo-arenoso, com presença de pedras e galhos.

Ribeirão Apertados (AP): está localizado no sul do município de Londrina. O local dos testes (23°27'44,6"S–51°07'38,6"W) apresenta suas margens fazendo limites com culturas rotativas de milho, soja e trigo, dependendo da época do ano. Apresenta pouca mata ciliar, com ausência desta em alguns trechos, substrato argilo-arenoso, com presença de poucas rochas.

Ribeirão Jacutinga (JC): está localizado no limite urbano/rural norte do município de Londrina, PR. O local dos testes ($23^{\circ}13'36,2''S - 50^{\circ}38'42,7''W$) possui sua margem direita com predominância de capim colonião e presença de poucas árvores, com plantações de milho e soja que chegam muito próximas ao leito do ribeirão. O substrato é argilo-arenoso associado com matéria orgânica e presença de poucas rochas.

Figura 2.1- Localização dos pontos experimentais (triângulos) nos ribeirões Apertados, Jacutinga e Godoy, município de Londrina, PR



Fonte: o autor.

2.2.2 Organismos-Testes e Confinamento dos Peixes

Este experimento foi conduzido de acordo com os critérios aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação e Uso Animal da Universidade Estadual de Londrina (protocolo nº 214/12). Indivíduos juvenis de *P. lineatus* ($n = 216$, peso: $25,36 \pm 0,76$ g comprimento: $12,8 \pm 0,1$ cm [média \pm EP], idade: aproximadamente seis meses) foram obtidos de tanques de criação da Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina (EPUEL). Antes da realização dos testes *in situ*, 32 indivíduos retirados dos tanques de criação foram mantidos em caixas d'água de 500 L, contendo água de poço artesiano, com fluxo contínuo e aeração constante, sob fotoperíodo (12C:12E) e alimentados com ração comercial (Guabi®, 36 % de proteínas), por um período de uma semana. Após o período de aclimação, 16 peixes foram amostrados na própria EPUEL, para a verificação dos níveis basais dos biomarcadores para a espécie estudada, sendo este grupo denominado tempo inicial (T_0). O restante dos peixes foi então transportado para o campo em sacos plásticos contendo água com injeção de oxigênio. Os animais foram confinados em uma gaiola retangular ($n=16$ por gaiola) (60 x 50 x 40 cm; 120 L) (Fig. 2.2) com estrutura metálica e revestida com malha plástica de 5 mm, em cada ponto experimental, por um período de 96 h. As gaiolas foram completamente imersas (profundidade $\leq 1,5$ m), ficando em contato com o sedimento para que os animais pudessem se alimentar do substrato e ficaram firmemente ancoradas nos locais para impedir o seu deslocamento. Os experimentos foram conduzidos individualmente, em duas épocas do ano: inverno (período de seca) e verão (período chuvoso).

Durante as exposições em campo, parâmetros físicos e químicos da água (pH, condutividade, temperatura, turbidez) foram tomados no primeiro e último dia de confinamento dos peixes, por meio de um medidor multiparâmetro (HORIBA-U52). Amostras de águas superficiais e sedimentos foram coletadas em cada local, no começo e ao término do período de exposição e foram levadas ao laboratório, onde as mesmas foram devidamente processadas para análises de metais e determinação da dureza da água.

Figura 2.2- Gaiola utilizada nos experimentos *in situ*. Foto: LEFA/UUEL.

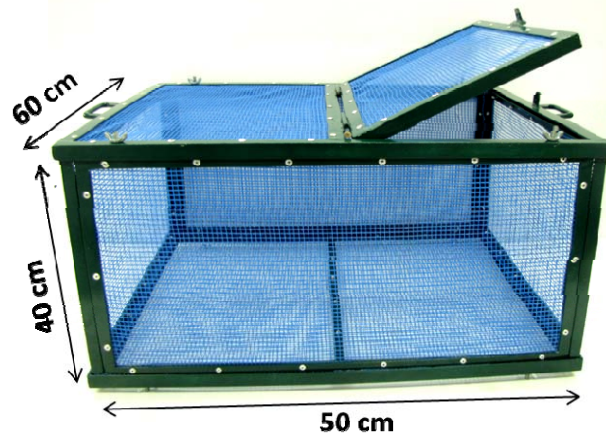


Foto: LEFA/UUEL.

2.2.3 Análises Químicas na Água e Sedimentos

2.2.3.1 Metais

Nas amostras de água e sedimentos dos três ribeirões foram determinados os metais: Cr, Cu, Pb, Zn, Cd e Ni. Para isto, 50 mL de água de cada local foram coletados e armazenados em tubos plásticos tampados, dos quais 25 mL foram filtrados em filtros com poros de 0,45 μm para a determinação de metais dissolvidos e nos 25 mL restantes foram avaliadas as concentrações de metais totais. As amostras de sedimento coletadas e previamente secas a 60°C, foram submetidas à agitação horizontal por 2 horas com ácido clorídrico (HCl) 0,1M para análise da quantidade de metais fracamente ligados. Após este período a suspensão foi filtrada (malha de 8 μm) e no filtrado foi determinada a concentração dos metais. Todas as amostras processadas, tanto de água quanto de sedimento foram fixadas em ácido nítrico a 1%, e armazenados em geladeira em tubos devidamente vedados, para posterior determinação de metais por ionização eletrotérmica em forno de grafite acoplado a espectrofotômetro de absorção atômica (Perkin Elmer AAnalyst 700).

2.2.3.2 Caracterização dos locais quanto a presença de agrotóxicos

A fim de caracterizar os ribeirões quanto à presença de alguns agrotóxicos, especialmente aqueles com grande persistência no ambiente, amostras de águas superficiais e sedimentos foram coletadas de cada ribeirão ao final da estação chuvosa (abril/2013) e foram processadas no Laboratório de Microcontaminantes Orgânicos e Ecotoxicologia, da Universidade Federal de Rio Grande (CONECO-FURG), onde se realizou a quantificação de inseticidas organoclorados e alguns herbicidas como a trifluralina, glifosato, atrazina, ametrina, irgarol, simazina e clomazone.

Para organoclorados, seguiu-se a metodologia descrita por Niencheski e Fillmann (2006). A identificação e quantificação de compostos organoclorados foi realizado em um cromatógrafo de fase gasosa (Perkin Elmer Clarus 500) equipado com detector de captura de elétrons ^{63}Ni (ECD) e um injetor automático de amostra. Os agrotóxicos clorados analisados foram α -HCH (hexaclorociclohexano), β -HCH, γ -HCH, δ -HCH, hexaclorobenzeno, diclorodifeniltricloroetano (somatório dos isômeros p,p'- e o,p-DDT), diclorodifenildicloroetileno (somatório dos isômeros p,p'- e o,p-DDE), diclorodifenildicloroetano (somatório dos isômeros p,p'- e o,p-DDD), aldrin, dieldrin, endrin, alfa-clordano, gama-clordano, transnonaclor, clortalonil, oxiclordano, heptacloro, heptacloro epóxido, diclofluanida, endosulfan (I, II e sulfato), metoxiclor, mirex e trifluralina. A identificação dos compostos foi baseada em espectros de massa individual e tempos de retenção no cromatógrafo em comparação com dados da literatura, dados da biblioteca e padrões autênticos. Padrões (2,4,5,6 -tetra-cloro-m-xileno [TCMX] e PCB 209) foram injetados e analisados sob as mesmas condições que as amostras. A recuperação foi avaliada usando os PCBs 103 e 198 como padrões de recuperação e o desempenho analítico foi avaliado através da análise de materiais de referência certificados e brancos analíticos. A confirmação de alguns compostos foi feita através da análise em um cromatógrafo a gás (Perkin Elmer Clarus 500) com espectrometria de massa (GC -MS).

2.2.4 Amostragem

Após o período de exposição, os peixes foram retirados das gaiolas e amostrados no próprio local de exposição. Inicialmente os animais foram anestesiados com benzocaína ($0,1\text{g L}^{-1}$ de água), medidos e pesados e tiveram amostras de sangue retiradas a partir da veia caudal. Os peixes foram mantidos em caixas plásticas contendo água do próprio local, até o momento de serem amostrados individualmente. Fígado, brânquias, cérebro e músculo foram retirados e armazenados em gelo até a chegada ao laboratório, onde os mesmos permaneceram congelados a -80°C até o momento das análises bioquímicas.

2.2.5 Biomarcadores

As amostras de fígado e brânquia foram pesadas, homogeneizadas (1:10 m/v) em tampão fosfato de potássio (0,1M, pH 7,0) e centrifugadas (10.000 g, 20 min, 4°C). O sobrenadante foi utilizado para análises dos seguintes biomarcadores bioquímicos:

2.2.5.1 Etoxiresorufina-O-deetilase (EROD)

A atividade da CYP1A foi determinada por meio da atividade da EROD, estimada pela taxa de conversão da 7-Etoxiresorufina em resorufina, seguindo-se o protocolo de Eggens e Galgani (1992), com algumas modificações. A reação foi iniciada pela adição da amostra na mistura reativa (tampão fosfato de K 0,1M; pH 7,6; NADPH 2 mM e 7-Etoxiresorufina 0,1 mM). O aumento progressivo da fluorescência, resultante da formação de resorufina, foi medido a cada minuto, durante 10 minutos (ex/em: 530/590nm). A atividade da EROD foi expressa em pmol de resorufina minuto^{-1} mg de proteína $^{-1}$, baseada em uma curva padrão de resorufina.

2.2.5.2 Glutationa-S-transferase (GST)

A atividade da glutatona-S-transferase (GST) foi determinada pelo monitoramento da complexação da glutatona reduzida (GSH) com o substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) em espectrofotômetro a 340 nm, de acordo com o método descrito por Keen et al.(1976). O aumento de CDNB conjugado foi monitorado durante 1 minuto, em espectrofotômetro a 340 nm e a atividade da enzima foi expressa em nmol de CDNB conjugado min^{-1} mg de proteína⁻¹.

2.2.5.3 Tióis não proteicos (NPSH)

A concentração de tióis não-proteicos (NPSH) nos tecidos foi determinada de acordo com o método de Beutler et al. (1963), através da reação dos grupamentos -SH com o reagente de cor 5,5-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico (DTNB), formando o tiolato (TNB) que foi quantificado em 412 nm. A concentração de tióis não proteicos foi expressa em μg NPSH. mg proteína⁻¹.

2.2.5.4 Lipoperoxidação (LPO)

Para avaliação da lipoperoxidação foi utilizado o ensaio TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, entre elas o malondialdeído [MDA]) de acordo com o protocolo descrito por Camejo et al. (1998). Ao sobrenadante foi acrescentado butilhidroxitolueno (BHT 1M), solução salina fosfatada (2 mM KCl; 1,4 mM NaH_2PO_4 ; 357 mM NaCl; 10 mM Na_2HPO_4 ; pH 7,4), ácido tricloroacético (TCA 50%) e ácido tiobarbitúrico (TBA 1,3%) dissolvido em 0,3% NaOH e a mistura foi mantida a 60°C em estufa por 1 hora. Posteriormente, foi feita a leitura de fluorescência (ex/em: 535/590 nm) e a concentração de TBARS determinada através de uma curva padrão de malondialdeído (MDA). A concentração de TBARS foi expressa em nmol de TBARS. mg de proteína⁻¹.

2.2.5.5 Carbonilação de proteínas (PCO)

Para avaliação de danos oxidativos em proteínas foi empregado o método descrito por Levine et al. (1994). O método consiste em reagir o 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) com as proteínas carboniladas, formando dinitrofenil-hidrazonas que podem ser detectadas a 358-370 nm. Primeiramente, 200 µl do sobrenadante, previamente normalizado para 2 mg.mL⁻¹ de proteína, foi adicionado a um eppendorf e misturado com 500 µl de DNPH a 10 mM, preparado em HCl a 2 M. O conteúdo do eppendorf foi misturado através de vortex durante 5 min e incubados a 30°C por 1,5 h. Após incubação, as proteínas foram precipitadas em 700 µl de TCA a 28% e centrifugados a 9.000 x g por 10 min. O pellet foi lavado três vezes por ressuspensão (etanol/acetato de etila 1:1), homogeneizado em vortex e centrifugado. As proteínas foram então solubilizadas em cloreto de guanidina a 6 M, centrifugadas a 9.000 x g por 5 min para remover quaisquer resíduos de material insolúvel. O conteúdo de carbonilas foi então determinado em espectrofotômetro de microplaca à 360 nm utilizando o coeficiente de absorção molar de 2,1x10⁴ M⁻¹.cm⁻¹ para hidrazonas. O branco recebeu o mesmo tratamento, contudo sem a adição do DNPH. Os resultados foram expressos nmol carbonilas por mg⁻¹ de proteína.

2.2.5.6 Proteínas semelhantes à metalotioneínas (PSMT)

O conteúdo de PSMT foi determinado segundo a metodologia descrita por Viarengo et al. (1997) com modificações. Os fígados foram homogeneizados (1:3 - m/v) em tampão específico (Sacarose 0,5 M, Tris 26 mM, fluoreto de fenilmetilsulfonil 0,5 mM, β-mercaptaetanol 1,3 mM) e centrifugadas por 45 minutos (21300 g; 4 °C); o sobrenadante foi submetido a fracionamento etanol/clorofórmio para obtenção de uma fração de metaloproteínas parcialmente purificada. Nesta fração foram quantificados os grupos sulfidril (-SH) utilizando-se o reagente de Ellman, em espectrofotômetro a 412 nm. A glutationa reduzida (GSH) foi utilizada como padrão e o conteúdo de metalotioneínas foi expresso em nmol de PSMT. mg de proteína⁻¹.

2.2.5.7 Acetilcolinesterase (AChE)

Amostras de tecido cerebral e muscular foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio (0,1 M; pH 7,5; 1:10 p/v) e centrifugadas (10.000 g, 20 min, 4 °C) e o sobrenadante foi utilizado para a determinação da atividade da AChE, de acordo com o método de Ellman et al. (1961), adaptado para microplaca por Alves Costa et al., (2007). A quantificação da atividade da AChE ($\text{nmol DTNB} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$) ocorreu a partir da reação do substrato de iodeto de acetilcolina (9 mM) com o reagente de cor contendo DTNB (0,5 mM). A tiocolina, produto da degradação do iodeto de acetilcolina pela AChE reage com o DTNB, formando o nitrobenzoato, uma ânion amarelo. As leituras da variação da absorbância da solução, durante 6 minutos, foram feitas por espectrofotometria a 415 nm e a atividade da AChE foi expressa em $\text{nmol min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$.

2.2.5.8 Proteínas totais

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976), que se baseia na reação de proteínas com o corante Coomassie Brilliant Blue G-250. A curva de calibração foi feita com albumina de soro bovino (BSA) e a absorbância lida em espectrofotômetro a 595 nm.

2.2.5.9 Biomarcadores genotóxicos

O ensaio alcalino do cometa com eritrócitos foi realizado de acordo com Singh et al. (1988), com algumas modificações descritas por Ramsdorf et al.(2009). Apenas as amostras de sangue que apresentaram viabilidade celular superior a 80%, determinada pelo método de exclusão por azul de Trypan, foram utilizadas no ensaio do cometa.

Após a amostragem, uma alíquota de sangue misturado com soro bovino fetal (1:100) foi adicionada a agarose de baixo ponto de fusão. Esta mistura foi colocada em lâmina de vidro previamente coberta com agarose normal, coberta com lamínula, e permaneceu na geladeira por 30 min. Em seguida as lamínulas foram retiradas e

as lâminas foram submetidas às seguintes etapas: a) lise: 1h, a 4°C, protegido da luz, em solução de lise (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, DMSO 10%, Triton X-100 1 mL, pH 10,0); b) desnaturação do DNA: 30 min, no escuro, em um tampão de eletroforese (NaOH 0,3 N, EDTA 1 mM, pH>13); c) eletroforese: 20 min, 300 mA, 25 V, 1 V cm⁻¹ e d) neutralização: três lavadas por 5 min cada com tampão (0,4 M Tris, pH 7,5). As lâminas foram então fixadas com etanol absoluto por 10 min e acondicionadas em geladeira até o momento de serem analisadas.

Posteriormente, as lâminas foram coradas com gelRed (Uniscience®) e analisadas em microscópio Leica (DM 2500) adaptado para fluorescência/epifluorescência, equipado com filtro de excitação azul (450-490 nm) e um filtro de barreira de 515 nm com magnificação de 1000X. Todas as lâminas foram analisadas em teste-cego, sendo avaliados 100 nucleóides por peixe. A extensão dos danos no DNA foi quantificada pelo comprimento da cauda formada pela migração dos fragmentos de DNA, sendo classificados em quatro classes de acordo com Kobayashi et al. (1995) (Fig.2.3): classe 0= sem dano aparente; classe 1= cauda curta menor que o diâmetro do núcleo; classe 2=comprimento da cauda correspondendo a uma ou duas vezes o diâmetro do núcleo; classe 3=comprimento da cauda maior que o dobro do diâmetro do núcleo. O escore de danos no DNA foi obtido pela multiplicação do número de células em cada classe pelo valor da classe. Os resultados de danos no DNA foram expressos pela média dos escores de danos de cada grupo, em cada local de exposição.

O teste do micronúcleo (MN) foi realizado com os eritrócitos dos peixes de acordo a técnica descrita por Heddle (1973) e Schimid (1975) e também foi analisada a ocorrência de alterações eritrocíticas nucleares (AENS) de acordo com Carrasco et al. (1990). Imediatamente após a amostragem, uma pequena quantidade de sangue retirada de cada animal foi estendida sobre duas lâminas de vidro limpas, secaram em temperatura ambiente overnight, foram fixadas com metanol por 10 min e coradas com Giemsa (10%). Um total de 3000 eritrócitos por peixe foram examinados em microscópio óptico (1000x magnificação). A frequência média de MN e AENS de cada ponto experimental foi calculada e expressa por 1000 células (‰). As AENS em três categorias: núcleo segmentado, núcleo lobulado e núcleo em forma de rim, além da presença de células binucleadas.

Figura 2.3- Classes de danos no DNA em eritrócitos de *Prochilodus lineatus*

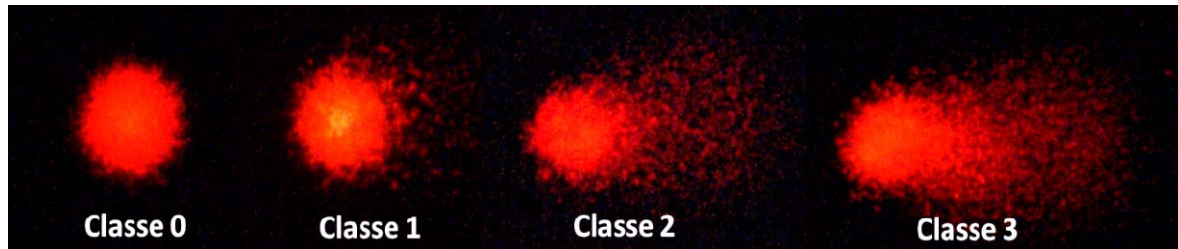


Foto: o autor

2.2.6 Índice Integrado de Respostas de Biomarcadores (IBR)

Os biomarcadores descritos na seção acima foram aplicados em um índice chamado de “Índice Integrado de Resposta de Biomarcadores” (IBR) descrito por Sanchez et al. (2013). Para o cálculo do valor de IBR de cada ponto experimental (GD, AP e JC), foram utilizados como referência os valores basais de cada biomarcador, obtidos com os peixes dos grupos iniciais (T_0). Desta forma, a razão dos locais experimentais individualmente e grupos iniciais para cada biomarcador foi logaritmizada (Y_i) e posteriormente calculada a média (μ) e o desvio padrão (s) gerais para cada parâmetro. Em seguida, os valores de Y_i foram padronizados através da fórmula: $Z_i = (Y_i - \mu)/s$ e a diferença entre Z_i e Z_0 (T_0) determinaram os valores de A. Por fim, o IBR foi calculado para cada local de exposição, por meio da somatória dos valores de A de cada biomarcador.

Em cada local, os parâmetros foram representados em um gráfico de radar, indicando o desvio do biomarcador investigado com relação ao tempo inicial (0). A área superior a 0 (zero) reflete indução do biomarcador, e menor que 0 indica diminuição da resposta do biomarcador.

2.2.7 Análises Estatísticas

Os dados dos biomarcadores foram testados quanto à normalidade e homogeneidade de variância usando o teste de Shapiro Wilks e de Levene, respectivamente. Os resultados obtidos com os biomarcadores analisados nos peixes submetidos aos testes *in situ* nos três pontos experimentais, em cada época

do ano foram comparados entre si através de análise de variância (ANOVA ou Kruskal-Wallis), de acordo com a distribuição dos dados (normalidade e homogeneidade da variância) seguida por um teste de comparações múltiplas quando indicado. Para as comparações das respostas dos biomarcadores em cada local entre as estações (inverno x verão) foi utilizado o teste *t* ou *Mann-Whitney*, de acordo com a normalidade dos dados. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$. Por fim, os dados apresentados nos gráficos representam a média \pm erro padrão.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Parâmetros Físicos e Químicos da Água

Os resultados dos parâmetros físicos e químicos da água, obtidos no primeiro e último dia de exposição dos peixes em cada local estão apresentados na Tabela 2.1. Dentro de cada estação, não foram observadas grandes variações entre os valores dos parâmetros físico e químicos entre os três locais avaliados. Porém, quando comparadas as duas estações, são observadas diferenças na temperatura e na turbidez, sendo que o aumento deste último parâmetro em todos os locais investigados durante o verão está diretamente relacionada com o maior aporte de partículas orgânicas e inorgânicas para dentro dos ribeirões bem como o revolvimento de material sedimentado. No verão os dados de O_2 dissolvido não puderam ser aferidos.

Tabela 2.1 – Valores dos parâmetros físicos, químicos da água aferidos no primeiro e último de exposição dos peixes nos ribeirões Apertados, Jacutinga e Godoy.

		pH	Cond. ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD (mg.mL^{-1})	Temp. ($^{\circ}\text{C}$)	Dureza ($\text{mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$)	Turbidez (NTU)
Tanques de aclimação (T₀)	I	7,2 ± 0,6	95 ± 1,8	9,9 ± 1,3	20,3 ± 1,0	45,6	1,3 ± 0,8
	V	6,1 ± 1,5	89 ± 3,6	-	22,3 ± 0,9	41,6	2,6 ± 0,7
Rib. Apertados	I	8,0 - 7,8	76 - 74	8,3 - 7,4	12,8 - 12,2	10,2 - 10,2	32,6 - 46,3
	V	6,5 - 6,8	98 - 106	-	21,2 - 21,7	10,5 - 10,5	101 - 38,3
Rib. Jacutinga	I	7,2 - 6,9	95 - 64	5,8 - 5,4	18,4 - 17,4	25,5 - 20,4	28,5 - 44,1
	V	5,9 - 6,5	64 - 72	-	21,5 - 21,6	28,4 - 28,4	116 - 102
Rib. Godoy	I	7,9 - 7,3	70 - 70	10,9 - 11,3	18,9 - 17,8	35,7 - 35,7	21,7 - 20,9
	V	6,8 - 7,2	74 - 80	-	19,5 - 20,7	30,2 - 30,2	70,4 - 56,1

OD: Oxigênio dissolvido; **I:** inverno e **V:** verão. Para os tanques de aclimação (T₀) de cada estação os valores foram agrupados e representados pela média ± desvio padrão. Para os ribeirões Apertados, Jacutinga e Godoy estão representados os valores medidos no primeiro e último dia de exposição (separados por hífen).

2.3.2 Análises de Agrotóxicos na Água e Sedimento

Os agrotóxicos avaliados nas amostras de água coletadas nos ribeirões Apertados, Jacutinga e Godoy, no outono de 2013, são apresentados na Tabela 2.2. Diversos compostos apresentaram concentrações superiores àquelas permitidas pela resolução CONAMA 357/2005, para águas de classes I e II. Dentre estes destacaram o DDT e seus metabólitos (DDE e DDD), hexaclorociclohexanos (HCH), heptacloro, diclofluanida e aldrins. De maneira geral, o ribeirão Apertados apresentou as maiores concentrações dos compostos analisados, tanto na água quanto no sedimento, seguido pelo ribeirão Jacutinga e Godoy.

2.3.3 Análises de Metais na Água e Sedimento

Os resultados das concentrações de alguns metais analisados em amostras de água e sedimento coletadas nos três ribeirões no outono de 2013 são apresentados na Tabela 2.3. De maneira geral foram observadas baixas concentrações dos metais analisados, inferiores às permitidas pela legislação

CONAMA 357/2005 para águas de classes 1 e 2 e CONAMA 344/2004, que apresenta limites de concentrações de metais no sedimento para áreas a serem dragadas, que representam os limiares de baixa probabilidade (Nível 1) ou provável (Nível 2) efeito adverso a biota. Nota-se também que para a maioria dos metais, as concentrações dentro dos corpos d'água variaram com a época do ano. No período chuvoso, embora ainda baixas, foram encontradas maiores concentrações dos metais Cu, Cr, Pb e Cd nas amostras de água e sedimento dos ribeirões, demonstrando um possível aporte destes metais para os ribeirões na estação mais chuvosa.

Tabela 2.2. Concentrações de alguns agrotóxicos nos ribeirões Apertados, Jacutinga e Godoy.

		Água ($\mu\text{g.L}^{-1}$)			LMA*	Sedimento ($\mu\text{g.Kg}^{-1}$)			LMA#
		APT	JAC	GOD		APT	JAC	GOD	
H	<i>Atrazina</i>	0,17	0,3	0,09	2	0,69	0,4527	0,3195	-
H	<i>Glifosato</i>	nd	nd	nd	65	< LQM	< LQM	< LQM	-
H	<i>Irgarol</i>	< LQM	< LQM	< LQM	-	< LQM	< LQM	< LQM	-
H	<i>Simazina</i>	0,0074	0,07	< LQM	2	0,73	0,77309	0,4378	-
H	<i>Ametrina</i>	0,23	0,41	0,13	-	0,013	0,1875	0,091	-
H	<i>Clomazone</i>	< LQM	< LQM	< LQM	-	< LQM	< LQM	< LQM	-
H	<i>Trifluralina</i>	0,159	0,099	0,014	0,2	0,349	0,298	0,033	-
I	<i>a-HCH</i>	0,159	0,093	0,023	0,02	0,549	0,250	0,025	-
I	<i>b-HCH</i>	0,127	0,061	0,012	0,02	0,439	0,126	0,032	-
I	<i>g-HCH</i>	0,050	0,032	0,008	0,02	0,166	0,077	0,022	0,94 ¹ - 1,38 ²
I	<i>d-HCH</i>	0,001	0,000	< LQM	0,02	0,004	0,001	< LQM	-
I	<i>HCB</i>	< LQM	0,001	0,001	0,0065	< LQM	0,004	0,005	-
I	<i>Clortalonil</i>	0,002	0,001	< LQM	-	0,004	0,002	0,002	-
I	<i>Oxclordano</i>	0,008	0,003	0,001	-	0,023	0,008	0,001	-
I	<i>Diclofluanida</i>	0,038	0,027	0,002	-	0,212	0,010	0,006	-
I	<i>Aldrim</i>	0,027	0,021	0,006	0,005	0,078	0,056	0,032	-
I	<i>Heptacloro hepóxido</i>	nd	< LQM	0,001	0,01	nd	< LQM	0,003	-
I	<i>Heptacloro</i>	0,147	0,080	0,016	0,010	0,356	0,012	0,043	-
I	<i>a-clordano</i>	nd	nd	nd	0,04	nd	nd	nd	-
I	<i>g-clordano</i>	0,012	0,006	nd	0,040	0,024	0,012	nd	-
I	<i>Transnonaclor</i>	nd	nd	nd	-	nd	nd	nd	-
I	<i>Endosulfan I</i>	nd	nd	nd	0,056	nd	nd	nd	-
I	<i>Endosulfan II</i>	0,045	0,003	0,002	0,056	0,214	0,008	0,003	-
I	<i>Endosulfan sulfato</i>	nd	nd	nd	0,056	nd	nd	nd	-
I	<i>Endrim aldeído</i>	nd	nd	nd	0,004	nd	nd	nd	-
I	<i>Endrim</i>	nd	nd	nd	0,004	nd	nd	nd	2,67 ¹ - 62,4 ²
I	<i>Endrim cetona</i>	nd	0,001	0,002	0,004	nd	0,002	0,004	-
I	<i>Dieldrin</i>	nd	nd	nd	0,005	nd	nd	nd	2,85 ¹ - 6,67 ²
I	<i>op-DDT</i>	nd	nd	nd	0,002	nd	nd	nd	1,19 ¹ - 4,77 ²
I	<i>pp-DDT</i>	0,003	0,196	0,044	0,002	0,011	0,559	0,068	1,19 ¹ - 4,78 ²
I	<i>op-DDE</i>	0,006	0,005	0,002	0,002	0,028	0,011	0,003	1,42 ¹ - 6,75 ²
I	<i>pp-DDE</i>	0,006	0,004	0,002	0,002	0,022	0,021	0,003	1,42 ¹ - 6,75 ²
I	<i>op-DDD</i>	nd	< LQM	< LQM	0,002	< LQM	< LQM	< LQM	3,54 ¹ - 8,51 ²
I	<i>pp-DDD</i>	0,025	0,016	0,006	0,002	0,058	0,035	0,009	3,54 ¹ - 8,51 ²
I	<i>Metoxiclor</i>	nd	nd	nd	0,030	nd	nd	nd	-
I	<i>Mirex</i>	nd	nd	nd	-	nd	nd	nd	-

H = herbicida; I = inseticida; <LQM = abaixo do limite de detecção confiável (0,0006); nd = não detectado; LMA = limite máximo aceitável, baseados na legislação CONAMA 357/2005 para águas de classe I e II* e CONAMA 344/2004# que apresenta limites de concentrações de alguns compostos no sedimento para áreas a serem dragadas, que representam os limiares de baixa probabilidade (Nível 1)¹ ou provável (Nível 2)² efeito adverso a biota.

1 **Tabela 2.3** – Concentrações dos metais avaliados na água ($\mu\text{g.L}^{-1}$) e sedimento (mg.Kg^{-1}) dos ribeirões Apertados, Jacutinga
2 e Godoy, nos períodos de inverno e verão.

		Apertados		Jacutinga		Godoy		LMA* ($\mu\text{g/ L}$)	LMA# (mg/ Kg)
		I	V	I	V	I	V		
Cu	T	2,82 ± 0,65	7,2 ± 1,39	nd	4,89 ± 0,40	2,86 ± 0,51	12,01 ± 0,6	d 9	35,7 ¹ 197 ²
	D	1,79 ± 0,26	2,95 ± 0,30	nd	3,46 ± 0,67	2,36 ± 0,34	5,78 ± 0,71		
	S	27,53	93	47,54	-	27,87	23,5		
Cr	T	0,73 ± 0,06	7,08 ± 3,16	0,85	1,22 ± 0,11	0,87 ± 0,04	8,41 ± 0,18	50	37,3 ¹ 90 ²
	D	0,52 ± 0,02	0,85 ± 0,05	0,32	0,49 ± 0,01	0,96 ± 0,08	4,83 ± 0,34		
	S	9,15	4,08	6,98	5,45	1,06	1,89		
Pb	T	nd	9,18 ± 0,57	nd	5,78 ± 0,19	nd	2,17 ± 0,21	10	35 ¹ 91,3 ²
	D	nd	5,47 ± 0,14	nd	4,29 ± 0,16	nd	1,93 ± 0,01		
	S	4,57	3,21	1,58	2,68	8,63	11,52		
Cd	T	0,7 ± 0,07	0,92 ± 0,05	nd	nd	nd	nd	1	0,6 ¹ 3,5 ²
	D	0,08 ± 0,01	0,12 ± 0,06	nd	nd	nd	nd		
	S	0,106	0,07	nd	0,015	nd	0,023		
Zn	T	nd	nd	nd	nd	nd	nd	180	123 ¹ 315 ²
	D	nd	nd	nd	nd	nd	nd		
	S	nd	0,0099	nd	0,017	0,006	0,001		
Ni	T	1,4 ± 0,08	1,8 ±	1,42 ± 0,2	nd	1,93 ± 0,26	0,55 ± 0,08	25	18 ¹ 35,9 ²
	D	0,98 ± 0,03	0,74 ±	0,65 ± 0,07	nd	1,09 ± 0,06	0,06 ± 0,01		
	S	1,88	2,46	2,58	1,86	0,86	1,05		

3 I= inverno; V= verão; T= total; D e ^d= dissolvido; S= sedimento; nd= não detectado. Com exceção dos valores de metais para sedimentos, os valores representam a
4 média ± desvio padrão, obtidos a partir das amostras coletadas no primeiro e último dia de exposição dos peixes em cada local. LMA = limite máximo aceitável,
5 baseados na legislação CONAMA 357/2005 para águas de classe I e II* e CONAMA 344/2004[#] que apresenta limites de concentrações de alguns compostos no
6 sedimento para áreas a serem dragadas, que representam os limiares de baixa probabilidade (Nível 1)¹ ou provável (Nível 2)² efeito adverso a biota

2.3.4 Biomarcadores

Valores basais dos biomarcadores

Os valores basais para o biomarcadores analisados nos diferentes órgãos de *P. lineatus*, em cada estação, podem ser observados na Tabela 2.4. Dentro de cada estação, as respostas dos biomarcadores para os grupos iniciais (T_0) foram homogêneas e foram então agrupadas em um único valor (média \pm EP). Porém, quando comparadas as duas estações nota-se variações em alguns parâmetros, como a GST no fígado, conteúdo hepático de NPSH, PCO em fígado e brânquias, concentração de PSMT e atividade da AChE em cérebro e músculo.

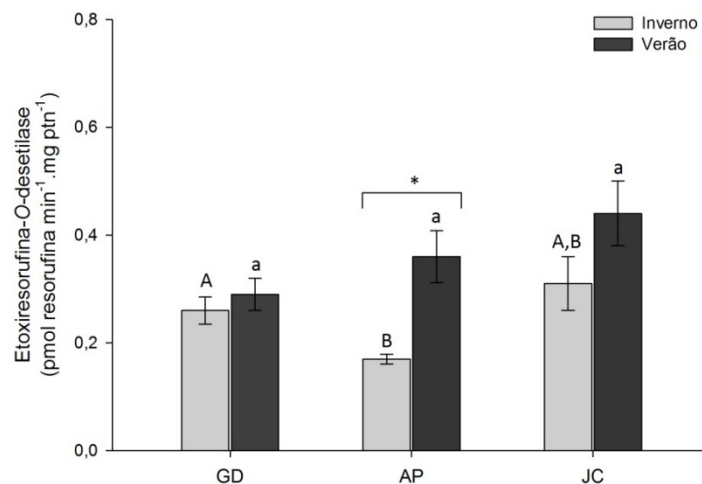
Tabela 3.4 - Valores basais dos biomarcadores (média \pm EP, n=20-24) analisados em diferentes órgãos de *P. lineatus* dentro de cada estação. * indica diferença significativa para cada biomarcador entre as estações ($p < 0,05$).

Parâmetro	Órgão/tecido	Inverno	Verão
EROD (pmol resorufina min ⁻¹ . mg ptn ⁻¹)	Fígado	0,30 \pm 0,02	0,37 \pm 0,03
GST (nmol CDNB conjugados min ⁻¹ .mg ptn ⁻¹)	Fígado	80,62 \pm 4,54	155,62 \pm 5,47*
	Brânquia	101,79 \pm 6,53	92,02 \pm 4,68
NPSH (μ g-SH.mg ptn ⁻¹)	Fígado	5,46 \pm 0,42	15,94 \pm 1,15*
	Brânquia	15,12 \pm 1,50	11,63 \pm 0,93
LPO (nmol TBARS.mg ptn ⁻¹)	Fígado	0,57 \pm 0,04	0,59 \pm 0,04
	Brânquia	6,36 \pm 0,85	5,39 \pm 0,57
PCO (nmol carbonil.mg ptn ⁻¹)	Fígado	0,0023 \pm 0,0001	0,0031 \pm 0,0002*
	Brânquia	0,0026 \pm 0,0002	0,0039 \pm 0,0004*
PSMT (μ g PSMT.mg ptn ⁻¹)	Fígado	10,15 \pm 0,82	4,78 \pm 0,36*
AChE (nmol min ⁻¹ .mg ptn ⁻¹)	Cérebro	42,62 \pm 1,81	55,87 \pm 1,94*
	Músculo	78,73 \pm 2,92	105,2 \pm 4,08*
Danos no DNA (Escore de danos no DNA)	Eritrócitos	95,72 \pm 2,19	85,46 \pm 3,21
AENS (Frequência de AENS %)	Eritrócitos	3,16 \pm 0,33	2,88 \pm 0,18

7-Etoxiresorufina-O-deetilase (EROD)

Os resultados da atividade da EROD no fígado dos peixes estão apresentados na figura 2.4. No inverno, houve uma diminuição significativa na atividade da EROD no fígado dos peixes confinados no ribeirão Apertados ($p = 0,003$), com relação aos demais grupos. Já no verão, não foi observada diferença significativa na atividade da EROD no fígado dos peixes confinados nos pontos experimentais, sendo a atividade desta enzima maior no período do verão quando comparado com o inverno, no mesmo local ($p = 0,036$).

Figura 2.4 – Atividade da 7-etoxiresorufina-O-desetilase (EROD) em fígado de *P. lineatus* submetidos a testes *in situ* por 96 horas nos ribeirões Godoy (GD), Apertados (AP) e Jacutinga (JC).



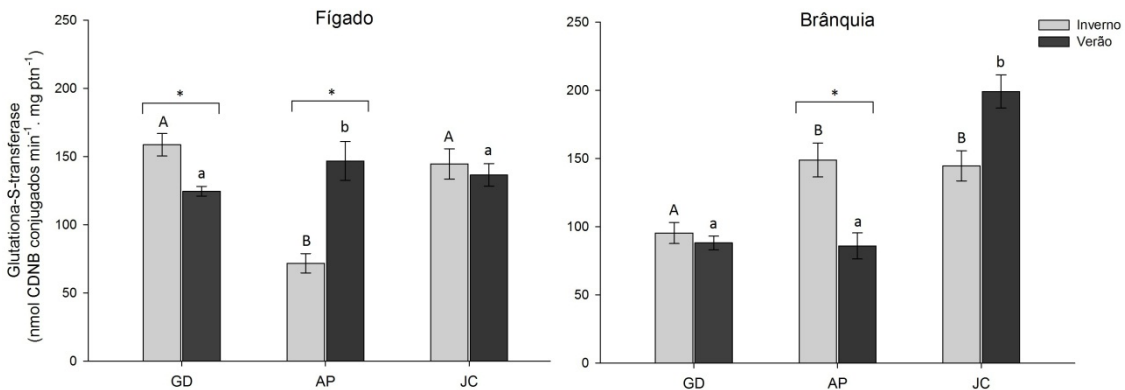
As barras representam a média e as linhas verticais o EP. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos, considerando-se a mesma estação do ano: letras maiúsculas - inverno e letras minúsculas – verão. * indica diferença significativa dentro de cada local entre as estações ($p < 0,05$).

Glutathiona-S-transferase (GST)

A atividade da GST mostrou-se diminuída no fígado dos peixes confinados no ribeirão Apertados ($p < 0,001$) durante o inverno (Fig. 2.5). O inverso foi observado no período do verão, onde a atividade enzimática mostrou-se aumentada no fígado dos peixes expostos no mesmo ribeirão ($p < 0,001$) quando comparado com os demais locais. Com relação à atividade da GST nas brânquias (Fig. 2.5), no inverno foi

observado um aumento significativo ($p < 0,015$) na atividade da GST nos peixes expostos aos ribeirões Apertados e Jacutinga quando comparados ao ribeirão Godoy. No verão, foi observado um aumento na atividade enzimática nas brânquias dos peixes confinados apenas no Jacutinga com relação aos demais ($p < 0,001$). Diferenças na atividade da GST nos peixes expostos no mesmo local entre as duas estações tão puderam ser observadas, tanto no fígado quanto na brânquia.

Figura 2.5 – Atividade da Glutaciona-S-transferase (GST) em fígado e brânquia de *P. lineatus* submetidos a testes *in situ* por 96 horas nos ribeirões Godoy (GD), Apertados (AP) e Jacutinga (JC)



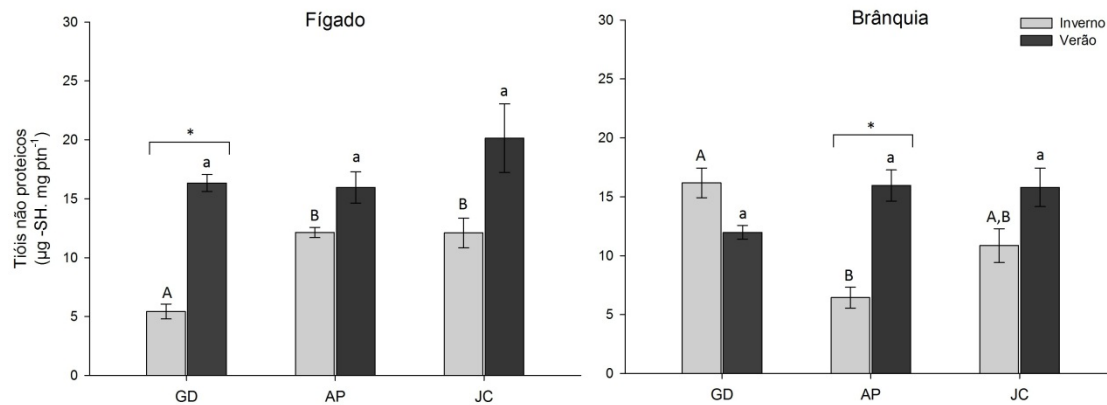
As barras representam a média e as linhas verticais o EP. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos, considerando-se a mesma estação do ano: letras maiúsculas - inverno e letras minúsculas – verão. * indica diferença significativa dentro de cada local entre as estações ($p < 0,05$).

Tióis não proteicos (NPSH)

No inverno foi observado aumento significativo no conteúdo de tióis não proteicos no fígado dos peixes confinados nos ribeirões Apertados ($p < 0,001$) e Jacutinga ($p < 0,001$) (Fig.2.6). No verão não foi observada diferença significativa na concentração de tióis não proteicos no fígado dos peixes. A concentração hepática de NPSH maior nos peixes confinados no ribeirão Godoy durante o verão quando comparado com o inverno ($p < 0,001$). Nas brânquias foi observada uma diminuição significativa apenas no ribeirão Apertados, durante o período de inverno ($p = 0,027$),

concentração esta menor do que daquela observada nos peixes no período do verão ($p = <0,001$) para o mesmo local.

Figura 2.6 – Conteúdo de tióis não proteicos (NPSH) em fígado e brânquia de *P. lineatus* submetidos a testes *in situ* por 96 horas nos ribeirões Godoy (GD), Apertados (AP) e Jacutinga (JC).

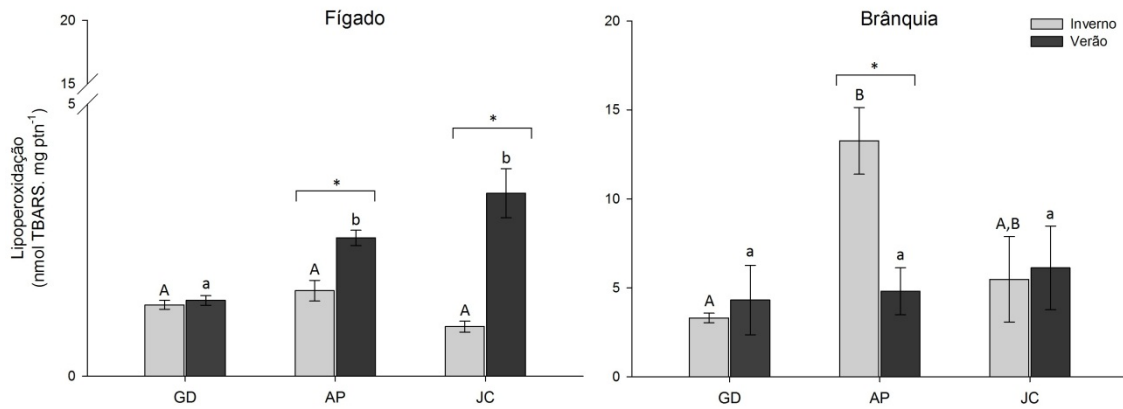


As barras representam a média e as linhas verticais o EP. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos, considerando-se a mesma estação do ano: letras maiúsculas - inverno e letras minúsculas – verão. * indica diferença significativa dentro de cada local entre as estações ($p < 0,05$).

Lipoperoxidação (LPO)

No inverno, não foi evidenciado lipoperoxidação no fígado dos peixes (Fig.2.7). Já no verão, foi observado um aumento do conteúdo de MDA no fígado dos peixes confinados nos ribeirões Apertados e Jacutinga com relação aos peixes confinados no ribeirão Godoy ($p = 0,026$). Nas brânquias, foi observado aumento significativo ($p < 0,001$) da LPO apenas nos peixes confinados no ribeirão Apertados, durante o inverno. A LPO foi maior no fígado dos peixes confinados no ribeirão Apertados e Jacutinga, durante o verão, em comparação com o inverno. Já nas brânquias, a LPO mostrou-se maior durante o inverno nos peixes engaiolados no rib. Apertados ($p = 0,001$).

Figura 2.7 – Lipoperoxidação (LPO) em fígado e brânquia de *P. lineatus* submetidos a testes *in situ* por 96 horas nos ribeirões Godoy (GD), Apertados (AP) e Jacutinga (JC).

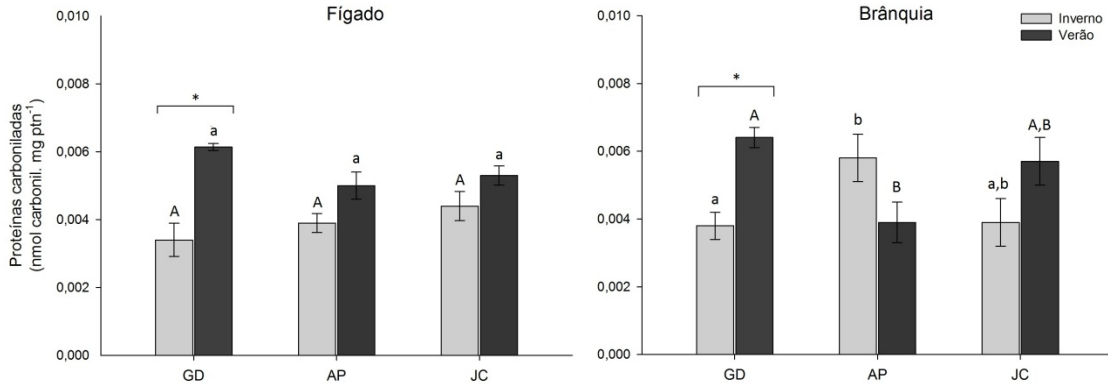


As barras representam a média e as linhas verticais o EP. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos, considerando-se a mesma estação do ano: letras maiúsculas - inverno e letras minúsculas – verão. * indica diferença significativa dentro de cada local entre as estações ($p < 0,05$).

Carbonilação de proteínas (PCO)

O aumento da concentração de proteínas carboniladas só foi evidenciado nas brânquias dos peixes confinados no ribeirão Apertados, durante o inverno ($p < 0,001$; Fig. 2.8). No fígado não foi observado a ocorrência de carbonilação de proteínas em nenhum dos locais, em ambas as estações. A ocorrência de PCO foi significativamente maior, tanto em fígado quanto em brânquia, nos peixes confinados no ribeirão Godoy, durante o verão.

Figura 2.8 – Proteínas carboniladas em fígado e brânquia de *P. lineatus* submetidos a testes *in situ* por 96 horas nos ribeirões Godoy (GD), Apertados (AP) e Jacutinga (JC). As barras representam a média e as linhas verticais o EP

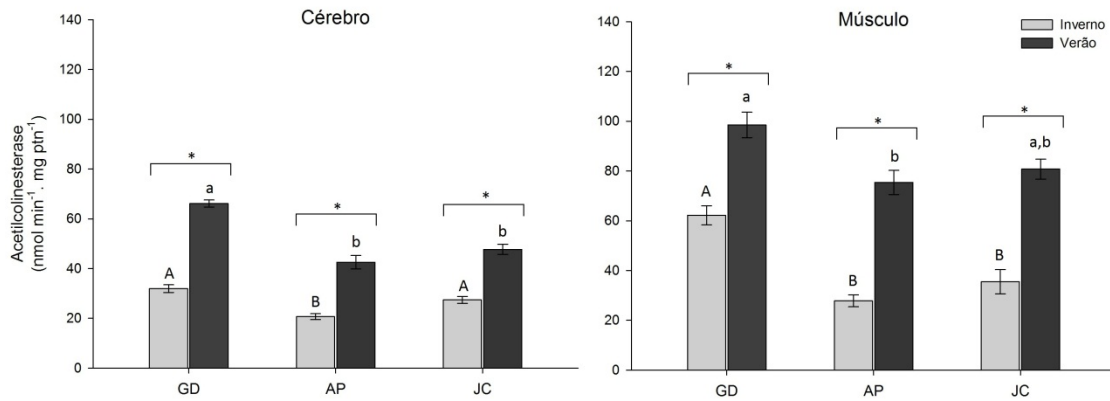


Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos, considerando-se a mesma estação do ano: letras maiúsculas - inverno e letras minúsculas – verão. * indica diferença significativa dentro de cada local entre as estações ($p < 0,05$).

Acetilcolinesterase (AChE)

Nos experimentos realizados no inverno, foi observada uma diminuição da atividade da acetilcolinesterase no cérebro dos peixes expostos ao ribeirão Apertados ($p < 0,001$) com relação aos demais. No período do verão, foi observada diminuição da atividade da AChE cerebral ($p < 0,001$) nos peixes confinados tanto no ribeirão Apertados quanto no Jacutinga (Fig. 2.9). No músculo foi observado diminuição significativa na atividade da AChE nos peixes confinados nos ribeirão Apertados, tanto no inverno quanto no verão (inverno: $p = 0,005$; verão: $p = 0,006$) (Fig.2.9) e nos peixes mantidos no ribeirão Jacutinga durante o inverno ($p = 0,005$). A atividade da AChE tanto em cérebro quanto em músculo foi maior durante o verão em todos os grupos, quando comparado com o inverno.

Figura 2.9 – Atividade da acetilcolinesterase em cérebro e músculo de *P. lineatus* submetidos a testes *in situ* por 96 horas nos ribeirões Godoy (GD), Apertados (AP) e Jacutinga (JC).

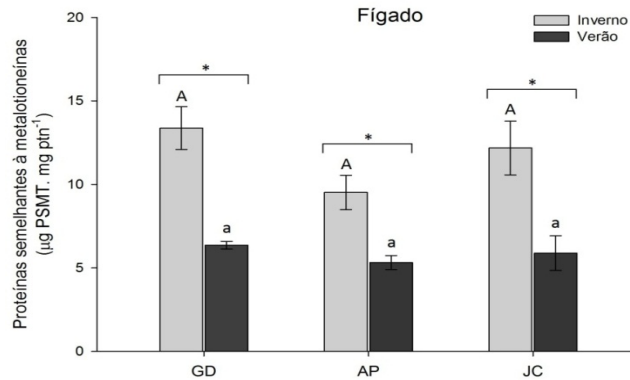


Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos, considerando-se a mesma estação do ano: letras maiúsculas - inverno e letras minúsculas – verão. * indica diferença significativa dentro de cada local entre as estações ($p < 0,05$).

Proteínas semelhantes à metalotioneínas (PSMT)

Não houve diferenças significativas no conteúdo de PSMT no fígado dos peixes expostos aos três pontos experimentais, tanto no inverno ($p = 0,161$) quanto no verão ($p = 0,935$) (Fig. 2.10). O conteúdo hepático de PSMT foi maior no inverno com relação ao verão, em todos os pontos experimentais.

Figura 2.10 – Concentração de proteínas semelhantes à metalotioneínas em fígado de *P. lineatus* submetidos a testes *in situ* por 96 horas nos ribeirões Godoy (GD), Apertados (AP) e Jacutinga (JC).

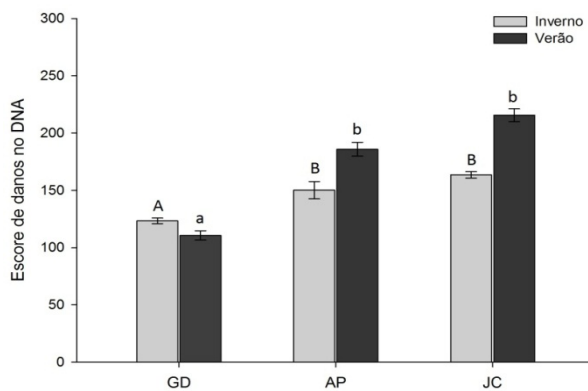


Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos, considerando-se a mesma estação do ano: letras maiúsculas - inverno e letras minúsculas – verão. * indica diferença significativa dentro de cada local entre as estações ($p < 0,05$).

Danos no DNA- Teste do cometa

Os resultados obtidos com o ensaio do cometa mostraram aumento significativo na ocorrência de danos no DNA dos eritrócitos dos peixes expostos nos ribeirões Apertados e Jacutinga, com relação aos peixes expostos ao ribeirão Godoy, tanto no inverno ($p < 0,001$), quanto no verão ($p < 0,001$) (Fig. 2.11).

Figura 2.11 – Escore de danos no DNA em eritrócitos de *P. lineatus* submetidos a testes *in situ* por 96 horas nos ribeirões Godoy (GD), Apertados (AP) e Jacutinga (JC).

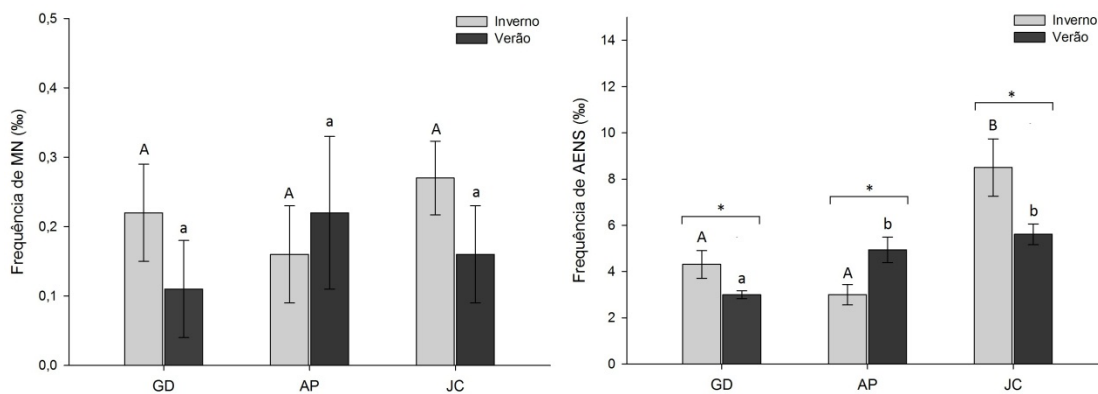


Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos, considerando-se a mesma estação do ano: letras maiúsculas - inverno e letras minúsculas – verão. * indica diferença significativa dentro de cada local entre as estações ($p < 0,05$).

Micronúcleo (MN) e Alterações Eritrocíticas Nucleares (AENS)

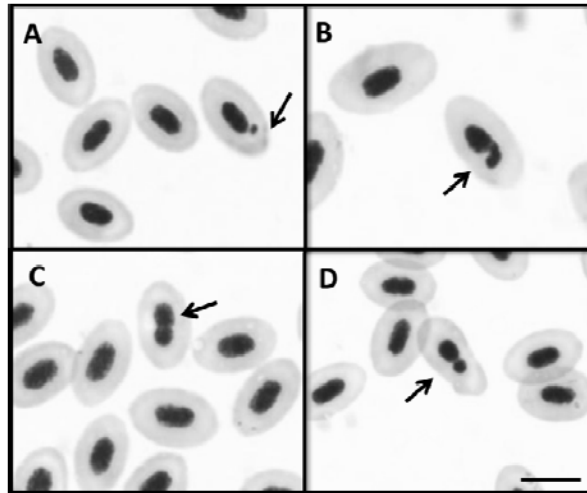
Não foi observado um aumento significativo na frequência de células micronucleadas nos peixes confinados em nenhum dos pontos experimentais, em ambas as estações (Fig. 2.12). Já a frequência de AENS foi significativamente maior nos peixes mantidos nos ribeirão Jacutinga ($p < 0,001$), durante o inverno com relação aos demais locais. No verão, houve um aumento significativo ($p = 0,002$) na frequência de AENS nos peixes confinados também no ribeirão Jacutinga e Apertados (Fig. 2.12). As principais AENS encontradas podem ser visualizadas na Fig. 2.13.

Figura 2.12 – Frequência de micronúcleos e alterações nucleares em eritrócitos de em de *P. lineatus* submetidos a testes *in situ* por 96 horas nos ribeirões Godoy (GD), Apertados (AP) e Jacutinga (JC).



Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos, considerando-se a mesma estação do ano: letras maiúsculas - inverno e letras minúsculas – verão. * indica diferença significativa dentro de cada local entre as estações ($p < 0,05$).

Figura 2.13 – Principais alterações nucleares encontradas em eritrócitos de *P. lineatus* expostos por 96 h aos rios Apertados, Jacutinga e Godoy.



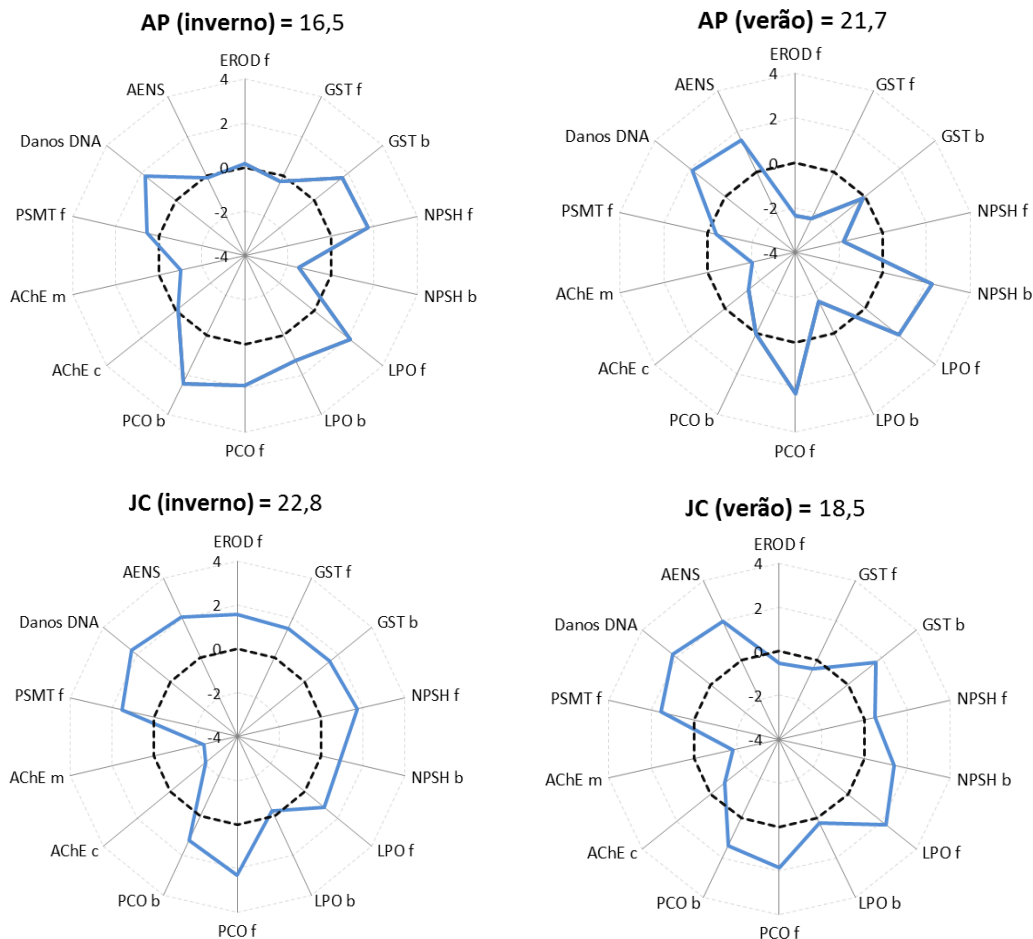
Em A) eritrócito com micronúcleo (seta) ao lado de eritrócitos normais; B) núcleo com constrição em forma de rim (seta); C) núcleo lobulado (seta); D) núcleo segmentado (setas). Coloração com Giemsa 10%. Barra= 10 μ m.

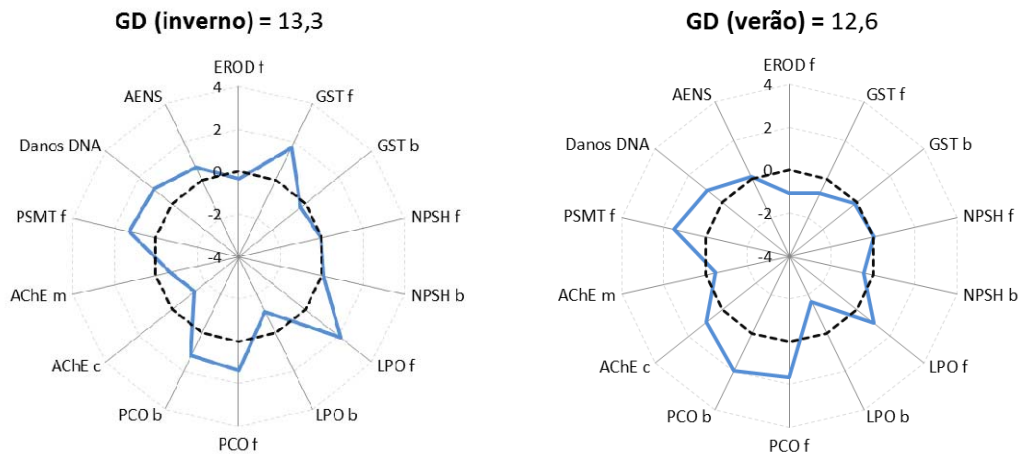
2.3.5 Índice Integrado de Respostas de Biomarcadores (IBR)

Os valores de IBR para cada local de realização dos testes *in situ* estão apresentados na Fig.2.14. Os resultados demonstram uma possível discriminação entre os locais avaliados em função do nível de contaminação encontrado nos mesmos. No experimento de inverno, o rio Jacutinga apresentou o maior valor de IBR (22,8), seguido pelo rio Apertados (16,5) e Godoy (13,3). No verão, ao contrário, o rio Apertados apresentou o maior valor de IBR (21,5), seguido então por Jacutinga (18,5) e Godoy (12,6). Desta forma, pelas respostas dos biomarcadores pode-se diferenciar que os rios Apertados e Jacutinga apresentam um nível mais elevado de contaminação com relação ao rio Godoy. Pelo gráfico de radar, é possível observar que o aumento nas respostas dos biomarcadores de efeito (LPO e danos no DNA) foram os biomarcadores mais representativos. A atividade da AChE, tanto cerebral quanto muscular, também mostrou-se satisfatória para este estudo, uma vez que foram observadas diminuições na atividade da enzima em vários pontos e em diferentes estações. Os valores de IBR obtidos para o rio Godoy foram praticamente iguais entre as duas estações, o que pode indicar uma menor oscilação no aporte de substâncias

químicas oriundas das atividades agrícolas do entorno entre o período seca e chuvoso, uma vez que este ponto encontra-se inserido em um fragmento florestal.

Figura 2.14 – Índice Integrado de Resposta de Biomarcadores (IBRv2): 7-etoxiresorufina-O-deetilase (EROD), glutathiona-S-transferase (GST), tióis não proteicos (NPSH), lipoperoxidação (LPO), proteínas carboniladas (PCO) acetilcolinesterase (AChE), proteínas semelhantes à metalotioneínas (PSMT), danos do DNA e alterações eritrocíticas nucleares (AENS) em diferentes órgãos (f = fígado, b = brânquia, c = cérebro e m = músculo) de *P. lineatus* submetidos a testes *in situ* por 96 horas nos ribeirões Apertados (AP), Jacutinga (JC) e Godoy (GD) nos períodos de inverno (seco) e verão (chuvoso).





Valores acima de 0 indicam um aumento na resposta do biomarcador e abaixo de 0 indicam diminuição da resposta do biomarcador com relação ao grupo inicial T₀ (linha tracejada).

2.4 DISCUSSÃO

No presente trabalho foram utilizados vários biomarcadores na espécie de peixe neotropical *P. lineatus* a fim de avaliar a qualidade da água de três ribeirões em áreas agrícolas, localizados no norte do Paraná e como estas repostas de biomarcadores são influenciadas por fatores ambientais sazonais, tais como a pluviosidade e temperatura. Os peixes apresentaram respostas nos biomarcadores relacionadas à exposição a contaminantes ambientais, demonstrando que todos os ribeirões analisados estão sendo afetados por aportes de substâncias químicas advindas das atividades agrícolas desenvolvidas na região, em diferentes graus de intensidade e nas diferentes épocas do ano. Os resultados deste trabalho também mostraram a utilidade de integrar vários biomarcadores para definir a exposição e os efeitos de agrotóxicos em condições reais de campo. Vale ressaltar, todavia, que a interpretação dos resultados de campo é sempre muito complexa, pois um grande número de fatores pode influenciar as variáveis analisadas de maneira não controlada (Zanette et al., 2006).

Os dados de pluviosidade, obtidos do Instituto Ambiental do Paraná, demonstram que quantidade de chuvas (mm) durante o período de realização dos testes *in situ* no inverno (julho/agosto 2013) foi cerca de 4 X menor do que o verão (janeiro/fevereiro 2014) e os valores de temperatura da água mensurados neste trabalho permitiram identificar uma sazonalidade entre as épocas do ano, sendo que a região de estudo apresenta um inverno frio e mais seco e um verão quente e

chuvoso. Também foram observadas diferenças nos valores de turbidez nas águas de todos os ribeirões no período do verão (chuvoso), comparado com o período de seca. A turbidez da água representa a quantidade de material particulado não dissolvido, encontrado suspenso no corpo d'água, composto por substâncias inorgânicas e orgânicas. Os sedimentos em suspensão podem carrear nutrientes e agrotóxicos, capazes de comprometer as funções fisiológicas dos peixes e até interferir na habilidade do animal de se alimentar ou escapar de seus predadores. O aumento da turbidez pode ocorrer em períodos chuvosos em função do grande aporte de material que é carregado para o corpo d'água em questão.

Foram observadas variações sazonais para as respostas de alguns biomarcadores nos peixes expostos *in situ*, tais como a EROD, GST, PCO, NPSH e AChE. Estas variações podem estar relacionadas com diferentes fatores, como variações pluviométricas, e consequente maior/menor aporte de xenobióticos para os ribeirões, como efeitos de diluição em decorrência do aumento do volume de água. Além disso, o tipo de cultivo agrícola nas diferentes estações pode afetar diretamente a composição química da mistura de agrotóxicos presente no ambiente aquático, uma vez que o sistema rotativo de culturas desenvolvido pelos agricultores da região utiliza diferentes compostos no controle de organismos indesejáveis aquele tipo de plantação específico. Todavia, é importante ressaltar que estas variações sazonais nas respostas dos biomarcadores apareceram nos peixes dos grupos iniciais (T_0), entre as duas estações do ano. Estas variações são de difícil interpretação, mas podem ser reflexas da idade, condição nutricional ou mesmo serem variações normais para a espécie, decorrentes de adaptações cronobiológicas.

Na região de estudo, a temperatura da água não apresentou grandes diferenças entre o inverno e verão, ficando esta diferença em torno de 3°C, com exceção do ribeirão Apertados que apresentou uma diferença de aproximadamente 9°C entre as duas estações. Variações na temperatura da água exercem papel importante no controle das respostas dos organismos ectotérmicos. Em baixas temperaturas alguns mecanismos celulares relacionados com a metabolização de xenobióticos podem apresentar atividade reduzida, afetando diretamente o processo de detoxificação (Buschini et al., 2003). Ao contrário, o aumento da temperatura

estimula todos os processos metabólicos, de acordo com princípios termodinâmicos (Lushchak et al., 2011).

Estas diferenças na temperatura podem estar relacionadas com o aumento de algumas atividades enzimáticas nos peixes durante o verão, como a GST no fígado e o aumento do conteúdo de tióis não proteicos no mesmo órgão.

O aumento da temperatura da água também promove um maior consumo de oxigênio pelos peixes, aumentando desta forma a produção de ERO como produto da intensificação do metabolismo, podendo resultar em estresse oxidativo (Heise et al., 2006; Lushchak e Bagnyukova, 2006; Bagnyukova et al., 2007). Quando observados danos oxidativos, como a LPO e PCO no fígado e danos no DNA, nota-se uma maior quantidade destes danos durante a estação mais quente, o que pode estar diretamente relacionado com o aumento da temperatura da água nos ribeirões investigados neste trabalho. Com a maior produção de ERO, é coerente se pensar no aumento das defesas do organismo para combater estes oxirradicais, como os níveis de tióis não proteicos, entre eles a glutathiona reduzida (GSH) e da atividade da GST, atuando na metabolização de subprodutos da peroxidação lipídica.

Os metais traços são contaminantes ambientais comumente encontrados na água, ar e solo (Braconi et al., 2011). O uso de elementos essenciais para o crescimento das plantas, tais como o cobre (Cu), zinco (Zn), ferro (Fe), manganês (Mn) e boro (B), é uma prática comum para corrigir deficiências do solo e, ao mesmo tempo, muitos agrotóxicos (fungicidas, inseticidas e herbicidas) contêm metais em suas formulações. Como um exemplo, o Cu é comumente utilizado como um fungicida e está presente em anti-helmínticos (inseticidas), enquanto que cádmio (Cd) e chumbo (Pb) podem entrar no solo como impurezas de fertilizantes (He et al., 2005). As análises de metais na água e sedimento dos ribeirões Apertados, Jacutinga e Godoy mostraram a presença de diferentes metais, que podem ter origem antropogênica. Destacaram os metais Cu, Cr e Pb como os mais abundantes nos ribeirões acima mencionados, e os metais Ni, Zn, Cd encontrados em menores concentrações. Apesar disto, os níveis desses metais encontrados tanto na água quanto no sedimento estão abaixo ou próximos dos limites permitidos pelas legislações vigentes (Tabela 3.3). Desta forma, os metais, de forma geral, não são considerados o maior problema de contaminação agrícola na região, principalmente pela baixa concentração em que foram encontrados.

Por outro lado, as análises químicas de alguns agrotóxicos nas águas dos ribeirões revelaram níveis preocupantes de alguns compostos, muito acima daqueles permitidos pela resolução CONAMA 357/2005. Entre estes, destacam-se os organoclorados como hexaclorociclohexanos (α , β e γ -HCH), que apresentaram valores acima do recomendado pela legislação, nas águas dos ribeirões Apertados e Jacutinga e o heptacloro, com concentrações acima do permitido nos três ribeirões estudados. Além disso, os três ribeirões apresentaram concentrações elevadas de pp-DDD e pp-DDT, com destaque para as concentrações de pp-DDT no ribeirão Jacutinga ($0,196 \mu\text{g L}^{-1}$) que foi quase 100x maior do que a concentração permitida pela legislação. Os metabólitos pp-DDE e pp-DDD também apresentaram concentrações elevadas e acima da legislação permitida, nas águas dos ribeirões Jacutinga e Apertados. De forma geral, o ribeirão Apertados apresentou as maiores concentrações da maioria dos agrotóxicos analisados, tanto na água quanto nos sedimentos, seguido pelo ribeirão Jacutinga e Godoy.

A enzima EROD representa indiretamente a atividade de enzimas de biotransformação de Fase I, da família CYP1A. Em muitas espécies de peixes, a subfamília CYP1A pode apresentar sua atividade modificada na presença de agrotóxicos e outros poluentes presentes no ambiente aquático (Van der Oost et al., 2003). No inverno, foi observada uma diminuição significativa na atividade da EROD no fígado dos peixes expostos no ribeirão Apertados, com relação aos demais locais, indicando possivelmente que o processo de biotransformação de fase I não está ocorrendo devidamente. Essa inibição da atividade da EROD pode ocorrer pela ação dos xenobióticos que podem competitivamente se ligarem ou alostericamente alterarem a estrutura do receptor Ah ou da CYP1A (Whyte et al., 2000), ou até mesmo podem afetar o processo de transcrição do gene da CYP1A (Salaberria, 2009). O efeito inibitório na atividade da EROD pode ser inferido pela elevada concentração de organoclorados encontrados na água. Em trabalhos de campo, Couillard et al., 2005 encontraram forte relação entre a diminuição da EROD em fígados de peixes com a exposição crônica a organoclorados. Da mesma forma, Kolankaya (2005) também verificou a diminuição da EROD em peixes expostos a águas superficiais contendo organoclorados como o BHC e HCHs. A inibição de enzimas P450 por alguns organofosforados também tem sido relatada na literatura (Fabrizi et al., 1999). Além disso, fatores abióticos, como a temperatura, já

comentado acima, pode ter exercido papel importante nas atividades enzimáticas, tanto da EROD quanto da GST, uma vez que as diferenças entre a temperatura entre o inverno e o verão no ribeirão Apertados foram de aproximadamente 9°C.

Com relação à atividade da enzima de biotransformação de fase II, a GST foram observadas respostas antagônicas entre as duas estações. No inverno, a atividade da GST mostrou-se diminuída no fígado dos peixes confinados nos ribeirão Apertados, e no verão foi encontrada uma diminuição da atividade da enzima nos mesmo local. O aumento da GST durante o verão pode ser facilmente relacionado com a exposição a compostos orgânicos que são metabolizados pela conjugação com a GSH. Diversos autores já relataram aumento na atividade da GST em diferentes espécies de peixes expostos a agrotóxicos, alguns dos quais são utilizados na região do presente estudo (Oruc et al., 2004; Gluszczak et al., 2006; Modesto e Martinez , 2010a; Rossi et al., 2011; Cattaneo, 2011; Dong et al., 2013). No verão, foi encontrada uma boa correlação positiva entre a atividade da EROD e da GST no fígado dos peixes ($r^2=0,987$), demonstrando que a diminuição da atividade da EROD em alguns locais avaliados tem alguma relação com a diminuição da atividade da GST. Desta forma, os mecanismos de detoxificação nestes peixes podem estar comprometidos, favorecendo a toxicidade dos xenobióticos. Nas brânquias, foi observado um aumento da atividade da GST nos peixes expostos aos ribeirões Apertados, no inverno e verão, e no ribeirão Jacutinga, durante o inverno. Este aumento da GST no inverno é suportado pelo aumento da síntese de NPSH, pelo fígado, já que estes dois parâmetros apresentaram uma boa correlação positiva.

Foi evidenciado no fígado dos peixes expostos aos ribeirões Apertados e Jacutinga, a ocorrência de lipoperoxidação (LPO) durante o verão, caracterizando um estado de estresse oxidativo. Nas brânquias, foi evidenciado aumento de LPO e PCO, nos peixes expostos ao ribeirão Apertados, no período de inverno, que pode estar relacionado com a diminuição do conteúdo de NPSH no órgão do peixe. Agrotóxicos, em geral, induzem alterações oxidativas que refletem no acúmulo de ERO, peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e do DNA (Bagchi et al., 1995; Franco et al., 2009). Este grupo de substâncias tóxicas pode induzir estresse oxidativo através de diferentes mecanismos: (i) introdução de ciclos redox (oxidação reversível) aceitando/doando elétrons aos constituintes celulares, podendo aumentar

assim o nível de ERO, (ii) pelo metabolismo celular alguns agrotóxicos podem necessitar do envolvimento de redutores, como a glutathione, esgotando assim suas reservas e resultando na diminuição do potencial antioxidante, (iii) inativação de enzimas antioxidantes e outras enzimas associadas, levando à diminuição do potencial antioxidante celular e por fim, (iv) modificação de processos vitais essenciais, tais como a transcrição e tradução, de forma não direta, aumentando os níveis de ERO em estado estacionário (Lushchak et al., 2011).

Entre os biomarcadores clássicos de estresse oxidativo, a quantificação de danos oxidativos é frequentemente adotada para avaliar o estresse oxidativo induzido por agrotóxicos em vários sistemas. Vários estudos têm demonstrado o efeito oxidativo de diferentes organoclorados, como o DDE, DDT, metoxicloro, hexaclorociclohexano (HCH), BHC, endrin, dieldrin e endosulfan em diferentes modelos animais (Numan, 1990; Videla et al., 1990; Bainy et al., 1994; Bachowski et al., 1998; Simon-Giavarotti, 2002; Song et al., 2006; Hu et al., 2010). Desta forma, a ocorrência de lipoperoxidação e carbonilação de proteínas nos peixes avaliados neste trabalho são potenciais biomarcadores de estresse oxidativo em decorrência da exposição a diferentes agrotóxicos organoclorados presentes nos ribeirões.

Em consequência da LPO pode haver perda de integridade da membrana com aumento de sua permeabilidade, alteração no fluxo de íons transmembrana, disfunção no transporte de Na^+/K^+ , influxo excessivo de cálcio e ativação de enzimas como as proteases, fosfolipases e nucleases (Meagher e Fitzgerald, 2000; Barreiros et al., 2006; Valavanidis et al., 2006). Algumas correlações positivas entre a LPO e danos no DNA, nas duas estações, permitem inferir os efeitos adicionais dos produtos da LPO sobre a oxidação de outros componentes celulares, como proteínas e ácidos nucleicos.

Agrotóxicos organofosforados (OPs) também têm sido relatados na literatura como indutores de estresse oxidativo em peixes. Por exemplo, o diclorvos induz estresse oxidativo em carpas *Cyprinus carpio* e no bagre *Ictalurus nebulosus* (Hai et al., 1997), e enguia européia *Anguilla anguilla* (Pena Llopis et al., 2003), o triclorfom em tilápia do Nilo (Thomaz et al., 2009), Folisuper 600 BR (metil-paration) em matrinxã *Brycon cephalus* (Monteiro et al., 2009) e o fention em *Oreochromis niloticus* (Piner et al., 2007). Da mesma forma, a indução de danos oxidativos em peixes por herbicidas são apontados na literatura; como o paraquat, que induziu

estresse oxidativo em *Channa punctata* (Parvez e Raisuddin, 2006), peixe-zebra (Bretaud et al., 2004) e truta arco-íris (Stephensen et al., 2002); o molinato, que também induziu o estresse oxidativo em *A. Anguilla* (Pena-Llopis et al., 2001) e o aminotriazol, que mostrou induzir estresse oxidativo em goldfish (Bagnyukova et al., 2005 a, b). Herbicidas à base de glifosato também são relatados como indutores de estresse oxidativo em peixes (Lushchak et al., 2009) como *Leporinus obtusidens* (Gluszczak et al., 2006), *Randhia quellem* (Gluszczak et al., 2007) e *P. lineatus* (Modesto e Martinez, 2010a).

Com relação à atividade da AChE, foi observado uma inibição da atividade desta enzima tanto no cérebro quanto no músculo dos peixes expostos aos ribeirões Apertados (em ambas as estações), e no cérebro dos peixes confinados no ribeirão Jacutinga durante o verão e no músculo dos peixes confinados no mesmo local também durante o inverno. A inibição da AChE está classicamente associada com o mecanismo de ação tóxica de inseticidas organofosforados e carbamatos (Payne et al., 1996) e distúrbios na sua atividade podem afetar a locomoção e equilíbrio em peixes, prejudicando a alimentação, escape e comportamento reprodutivo (Bretaud et al., 2000; Pessoa et al., 2011). Estes compostos inibem a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), que é responsável por encerrar a transmissão do impulso nervoso, bloqueando a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) nas sinapses neuronais do sistema nervoso central e periférico, levando ao acúmulo excessivo de ACh nas fendas sinápticas. Os efeitos tóxicos de OP se devem em grande parte à hiperatividade do sistema colinérgico, como resultado da acumulação de ACh na fenda sináptica (Shih e McDonough, 1997).

A atividade da AChE em peixes também pode ser modificada por agrotóxicos de outras classes, tais como organoclorados, como o endosulfan (Dutta e Arends, 2003) e herbicidas como o glifosato, em diferentes espécies de peixes (Gluszczak et al., 2006; Gluszczak et al., 2007; Cattaneo et al., 2011) e também dos produtos formulados a base de glifosato, o Roundup® e o Roundup Transorb®, em *P. lineatus* (Modesto e Martinez, 2010a; Modesto e Martinez, 2010b).

A glutathiona reduzida (GSH), um tripeptídeo que tem papel fundamental em reações de oxidação/redução, transporte de aminoácidos e detoxificação de muitos agentes tóxicos, constitui a primeira linha de defesa contra lesões celulares mediadas por oxidantes (Van der Oost et al., 2003). O aumento da concentração

hepática de tióis não proteicos (NPSH), entre eles a GSH, nos peixes confinados nos ribeirões Apertados e Jacutinga durante os experimentos de inverno pode estar relacionado com o aumento na produção de ERO, já que a GSH pode ser utilizada diretamente no combate destas espécies reativas de oxigênio. Nas brânquias, o conteúdo de glutathiona mostrou-se diminuída nos peixes confinados ao ribeirão Apertados, também no inverno, onde foi verificada a ocorrência de lipoperoxidação e carbonilação de proteínas. Neste caso, a diminuição dos níveis do antioxidante primário nestas células branquiais pode ter levado ao estabelecimento de estresse oxidativo neste órgão.

Metalotioneínas (MT) são proteínas importantes para a regulação e detoxificação de metais essenciais e não-essenciais. Metalotioneínas também possuem uma função importante na proteção das células contra o estresse oxidativo (Viarengo et al., 2000). No presente estudo, as concentrações de proteínas semelhantes à metalotioneínas (PSMT) avaliadas no fígado de *P. lineatus* não diferiram significativamente em nenhum dos experimentos, em ambas as estações. Estes resultados provavelmente podem estar relacionados com as baixas concentrações de metais presentes nos três ribeirões investigados, que não foram suficientes para promover a síntese de MT no fígado dos peixes.

Na avaliação de danos no DNA, observou-se um aumento nos escores de danos nos eritrócitos dos peixes confinados no ribeirão Apertados e Jacutinga, tanto no inverno quanto no verão. Também foi observado aumento na ocorrência de AENS nos eritrócitos dos peixes confinados nos ribeirões Jacutinga, nas duas estações e no ribeirão Apertados no período do verão. Os efeitos genotóxicos de vários grupos de agrotóxicos, como os organofosforados, organoclorados e piretróides têm sido demonstrados em testes *in vivo* e em *in vitro* (Bolognesi, 2003; Abdollahi et al, 2004; Kaushik & Kaushik 2007).

Os efeitos do glifosato sobre a estrutura do material genético em peixes também têm sido relatados na literatura, como nos trabalhos de Cavalcante e colaboradores (2008) que observaram um aumento de quebras no DNA em eritrócitos de *P. lineatus* expostos à formulação comercial do herbicida. Da mesma forma, Rossi et al., (2011) relataram um aumento na frequência de MN e AENS em indivíduos de *Astyanax sp.* expostos ao pesticida. Ramsdorf et al., (2012) monitorando uma área potencialmente contaminada com agrotóxicos, entre eles o

Roundup®, também observaram um aumento na frequência de AENS e MN e danos no DNA em espécies de *Astyanax sp.* Çavas & Konen (2007) observaram aumento na frequência de MN e ENA em *Carassius auratus* após quatro dias de exposição a diferentes concentrações de glifosato. Além destes agrotóxicos, o aumento na frequência de ENA e MN e quebras no DNA também já foram relatados em peixes expostos ao herbicida endossulfan (Neuparth et al., 2006; Pandey et al., 2006), um inseticida detectado nas águas dos ribeirões do presente estudo.

Outro herbicida amplamente utilizado nas monoculturas de milho da região de estudo é a atrazina. A atrazina, devido ao uso intenso, baixa reatividade e solubilidade, é comumente detectada no monitoramento de solos e águas subterrâneas. Seus resíduos e metabólitos podem ser encontrados nesses locais após um longo tempo de aplicação, pois seu tempo de vida médio varia de 20 até mais de 100 dias (Meli et al., 1992). Diversos autores têm relatado o efeito genotóxico da atrazina para peixes. Santos e Martinez (2012) verificaram que em *P. lineatus*, a atrazina mostrou-se genotóxica para células sanguíneas, branquiais e hepáticas. Çavas (2011) observou aumento significativo na ocorrência de danos no DNA e na frequência de micronúcleos em eritrócitos de *C. auratus*, após a exposição ao herbicida. Ventura et al. (2008) observaram aumento nas quebras no DNA e na frequência de MN e ENA em eritrócitos de *O. niloticus* expostos a diferentes concentrações de atrazina em apenas 72 horas de exposição. Da mesma forma, Nwani et al. (2011) verificaram um aumento de MN para o peixe *C. punctata* após sete dias de exposição a atrazina.

Apesar da frequência de MN não ter sido significativa em nenhum dos experimentos realizados, alterações eritrocíticas nucleares (AENS) foram observadas nos peixes confinados nos ribeirões Apertados e Godoy. Estes resultados corroboram os danos detectados pelo ensaio do cometa, onde foi observada uma correlação positiva ($r^2=0,999$) entre estes dois parâmetros. Poucas explicações existem acerca da origem destas AENS, sendo que uma das mais aceitas foi sugerida por Shimizu et al. (1998), os quais afirmam que ao ser detectada uma região com dano é iniciado um processo de reparo e eliminação da cromatina. Esta região alterada é então movida para a periferia do núcleo e então eliminada por exocitose e antes que este processo seja concluído a membrana nuclear naturalmente apresenta algumas imperfeições as quais caracterizam as AENS. Foi

encontrada também uma correlação positiva entre a LPO no fígado e a ocorrência de AENS, durante o verão. Alguns autores, como Seriani et al. (2011), apontam que o estresse oxidativo pode ser responsável pela formação de MN e AENS, em decorrência principalmente do aumento da permeabilidade da membrana nuclear como resultado da lipoperoxidação, tornando o núcleo mais susceptível à alterações promovidas por xenobióticos.

Recentemente, vários estudos descreveram a presença de anormalidades nucleares além do micronúcleo, em células de peixe expostas a substâncias genotóxicas (Ayllon & Garcia-Vazquez, 2000; Çavas e Ergene-Gozukara, 2005). Em geral essas anormalidades são consideradas indicadoras de danos genotóxicos e, portanto, podem complementar o escore de micronúcleos em pesquisas de genotoxicidade (Çavas e Ergene-Gozukara, 2005).

No decorrente trabalho, o estabelecimento do estado de estresse oxidativo nos peixes, evidenciado pela LPO e PCO, em fígado e brânquias pode também explicar, pelo menos em parte, a ocorrência de danos no DNA. Das espécies reativas de oxigênio, o radical hidroxil ($\cdot\text{HO}$) é o mais reativo com a molécula de DNA, reagindo com a molécula pela adição de ligações duplas nas bases nitrogenadas e pela remoção de um átomo de hidrogênio, tanto do grupo metil da base timina quanto de cada uma das ligações C-H da pentose desoxirribose (Lackner, 1998). Os processos de transcrição e de tradução também podem ser impedidos ou modificados, em função de lesões no DNA, induzidas pelos radicais livres.

O Índice Integrado de Resposta de Biomarcadores (IBRv2) foi capaz de discriminar os pontos de acordo com o nível de contaminação de cada local, com base nas respostas de vários biomarcadores. Os valores de IBR aferidos foram consistentes com as diferenças encontradas nos níveis de contaminação em cada local e com grau de interferência antrópica destes ambientes, uma vez que o menor valor de IBR, em ambas as estações foi encontrado no ribeirão Godoy, localizado dentro da unidade florestal, confirmando seu estado de melhor conservação entre os locais avaliados. Podemos relacionar desta maneira o efeito protetor dessa vegetação, principalmente como uma barreira ao escoamento superficial e lixiviação desses contaminantes oriundos das monoculturas do entorno, além da interceptação da cobertura vegetal à deriva de agrotóxicos aplicados via aérea. Os ribeirões

Apertados e Jacutinga apresentaram diferenças nos valores de IBR entre as estações de seca e chuva, diferenças estas que podem estar relacionadas com a dinâmica de entrada/saída dos xenobióticos ao longo do ano e efeitos de diluição. Em suma, através da análise integrada de diferentes biomarcadores, percebe-se que as alterações bioquímicas e genéticas observadas se correlacionaram bem com os níveis de contaminantes ambientais, demonstrando a eficiência desta abordagem para o biomonitoramento.

Este trabalho não tentou separar qual poluente presente no local de estudo foi o responsável pelos efeitos sobre os peixes e o ambiente aquático, mas sim, que há uma mistura de contaminantes que promoveram efeitos biológicos consequentemente podem ter um reflexo no ambiente. Apesar da dificuldade de interpretação da relação causa-efeito de uma determinada alteração nos organismos em condições de campo, o biomonitoramento permite uma avaliação mais ampla das condições naturais às quais os organismos estão sujeitos, o que de fato pode colaborar na discussão da efetividade de conservação de áreas degradadas, proporcionando promissores instrumentos para a identificação de impactos ambientais (da Silva et al., 2003).

Desta forma, os resultados encontrados neste trabalho são relevantes para o desenvolvimento de novos e contínuos programas de monitoramento na região, alertando para um sério problema ambiental, onde investigações mais detalhadas necessitam de serem realizadas a fim de compreender melhor a dinâmica do local e as variações sazonais que implicam em maior ou menor toxicidade para os organismos, bem como a elaboração de ações de manejo e conservação para estes ribeirões.

2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdollahi, M., Ranjbar, A., Shadnia, S., Nikfar, S., Rezaiee, A. 2004. Pesticides and oxidative stress: A review. *Medical Science Monitor*, 10, 144 -147.
- Alves Costa, J.R.M., Mela, M., Silva de Assis, H.C., Pelletier, E., Randi, M.A.F., Oliveira Ribeiro, C.A. 2007. Enzymatic inhibition and morphological changes in

- Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67, 82-88.
- ANVISA & UFPR. Seminário de mercado de agrotóxico e regulação. ANVISA, Brasília, 11 abril de 2012.
- Armas, E.D., Monteiro, R.T.R. 2005. Uso de agrotóxicos em cana-de-açúcar na Bacia do Rio Corumbataí e o risco da poluição hídrica. *Química Nova*, 28, 975-982.
- Ayllon, F., Garcia-Vazquez, E. 2000. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European in now *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. *Mutation Research*, 467, 177-186.
- Bacchetta, C., Cazenave, J., Parma, M.J. 2011. Responses of biochemical markers in the fish *Prochilodus lineatus* exposed to a commercial formulation of endosulfan. *Water Air Soil Pollut*, 216, 39–49.
- Bachowski, S., Xu, Y., Stevenson, D.E. 1998. Role of oxidative stress in the selective toxicity of dieldrin in the mouse liver. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 150, 301–9.
- Bagchi, D., Bagchi, M., Hassoun, E.A., Stohs, S.J. 1995. In vitro and in vivo generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. *Toxicology*, 104, 129–140.
- Bagnyukova, T.V., Storey, K.B., Lushchak, V.I. 2005a. Adaptive response of antioxidant enzymes to catalase inhibition by aminotriazole in goldfish liver and kidney. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B Biochemistry and Molecular Biology*, 142 (3), 335-341.
- Bagnyukova, T.V., Vasylykiv, O.Y., Storey, K.B., Lushchak, V.I., 2005b. Catalase inhibition by aminotriazole induces oxidative stress in goldfish brain. *Brain Research*, 1052, 180–186.
- Bagnyukova, T.V., Danyliv, S.I., Zin'ko, O.S., Lushchak, V.I., 2007. Heat shock induces oxidative stress in rotan *Perccottus glenii* tissues. *Journal of Thermal Biology*, 32, 255–260.
- Bainy, A.C., Silva, M.A., Kogake, M. 1994. Influence of lindane and paraquat on oxidative stress-related parameters of erythrocytes in vitro. *Human & Experimental Toxicology*, 13, 461–65.

- Barreiros, A.L.B.S., David, J.M., David, J.P. 2006. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, 29, 113-123.
- Beutler, E., Durom, O., Kelly, B.M. 1963. Improved method for the determination of blood glutathione. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 61, 882-890.
- Bolognesi, C. 2003. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutation Research*, 543, 251–272.
- Bonnineau, C., Moeller, A., Barata, C., Proia, L., Sans-Piché, F., Schmitt-Jansen, M., Guasch, H., H, Segner. 2012. In: Guasch, H., Ginebreda, A., Geiszinger, A. (Eds) *Advances in the Multibiomarker Approach for Risk Assessment in Aquatic Ecosystems. The Handbook of Environmental Chemistry- Emergency and Priority Pollutants in Rivers*. Berlin, Springer, pp.147-179.
- Braconi, D., Bernardini, G., Santucci, A. 2011. Linking protein oxidation to environmental pollutants: Redox proteomic approaches. *Journal of Proteomics*, 74, 2324– 2337.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Bretau, S., Toutant, J.P., Saglio, P. 2000. Effects of carbofuran, diuron and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicology Environmental Safety*, 47, 117–124.
- Buschini, A., Carboni, P., Martino, A., Poli, P., Rossi, C. 2003. Effects of temperature on baseline and genotoxicant induced DNA damage in haemocytes of *Dreissena polymorpha*. *Mutation Research*, 537, 81–92.
- Camargo, M.M.P., Martinez, C.B.R. 2006. Biochemical and physiological biomarkers in *Prochilodus lineatus* submitted to in situ tests in an urban stream in southern Brazil. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 21, 61–69.
- Camejo, G., Wallin, B., Enojärvi, M. 1998. Analyses of Oxidation and Antioxidants using Microtiter Plates. In: Armstrong, D. (ed). *Free radical and antioxidants protocols*. Humana Press, New Jersey, pp.377-387
- Carrasco, K.R., Tilbury, K.L., Myers, M.S. 1990. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, Ottawa, 47, 2123 -2136.

- Cattaneo, R., Clasen, B., Loro, V.L., Menezes, C.C., Pretto, A., Baldisserotto, B., Santi, A., Avila, L.A. 2011. Toxicological Responses of *Cyprinus carpio* Exposed to a Commercial Formulation Containing Glyphosate. *Bulletin Environmental Contamination Toxicology*, 87, 597-602.
- Cavalcante, D.G.S.M., Martinez, C.B.R., Sofia, S.H. 2008. Genotoxic effects of roundup on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutation Research*, 655, 41–46.
- Çavas T. 2011. In vivo genotoxicity evaluation of atrazine and atrazine-based herbicide on fish *Carassius auratus* using the micronucleus test and the comet assay. *Food Chemical Toxicology*, 49, 1431-1435.
- Çavas, T., Ergene-Goçukara, S. 2005. Micronucleus test in fish cells: a bioassay for in situ monitoring of genotoxic pollution in the marine environment. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 46, 64-70.
- Çavas, T., Könen, S. 2007. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagenesis* 22, 263–268.
- Cazenave, J., Bacchetta, C., Parma, M.J., Scarabotti, P.A., Wunderlin, D.A., 2009. Multiple biomarkers responses in *Prochilodus lineatus* allowed assessing changes in the water quality of Salado River basin (Santa Fe, Argentina). *Environmental Pollution*, 157, 3025–3033.
- Cazenave, J., Bacchetta, C., Rossi, A., Ale, A., Campana, M., Parma, M.J. 2014. Deleterious effects of wastewater on the health status of fish: A field caging study. *Ecological Indicators*, 38, 104-112.
- Couillard, C. M.; Lebeuf, M.; Ikonou, M. G.; Poirier, G. G.; Cretney, W. J. 2005. Low hepatic ethoxyresorufin-O-deethylase activity correlates with high organochlorine concentrations in Atlantic tomcod from the Canadian east coast. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24, 2459–2469.
- Da Silva, J., Heuser, V., Andrade, V. 2003. Biomonitoramento Ambiental. In: da Silva, J., Erdtmann, B., Henriques, J.A.P. *Genética Toxicológica*. Porto Alegre, Alcance, pp.167-178.
- Depledge, M.H., Aagaard, A., P. Gyorkost. 1995. Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioral biomarkers. *Marine Pollution Bulletin*, 31, 19-27.

- Dong, M., Zhu, L., Shao, B., Zhu, S., Wang, J., Xie, H., Wang, J., Wang, F. 2013. The effects of endosulfan on cytochrome P450 enzymes and glutathione S-transferases in zebrafish (*Danio rerio*) livers. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 92, 1-9.
- Dorts, J., Silvestre, F., Tu, H.T., Tyberghein, A-E., Phuong, N.T., Kestemont, P. 2009. Oxidative stress, protein carbonylation and heat shock proteins in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, following exposure to endosulfan and deltamethrin. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 28, 302–310.
- Dutta, H.M., Arends, D.A. 2003. Effects of endosulfan on brain acetylcholinesterase activity in juvenile bluegill sunfish. *Environmental Research*, 91, 157–162.
- Eggens, M.L., Galgani, F. 1992. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in flatfish-fast determination with a fluorescence plate-reader. *Marine Environmental Research*, 33, 213-221.
- Eisler, R. 1989. Atrazine hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. *Biological Report*, 85.
- Ellman, G.L.; Courtney, K.D.; Andres J.R.V.; Featherstone, R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88-95.
- Fabrizi, L., Gemma, S., Testai, E., Vittozzi, L. 1999. Identification of the cytochrome P450 isoenzymes involved in the metabolism of diazinon in the rat liver. *Journal of Biochemistry and Molecular Toxicology*, 13, 53–61.
- Franco, R., Sánchez-Olea, R., Reyes-Reyes, E.M., Panayiotidis, M.I. 2009. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Ménage à Trois. *Mutation Research*, 674,3–22.
- Giesy, J.P., Dobson, S., Solomon, K.R. 2000. Ecotoxicological risk assessment for roundup herbicide. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 167, 35-120.
- Gluszczak, L., Miron, D.S., Crestani, M., Fonseca, M.B, Pedron, F.A., Duarte, M.F., Vieira, V.L. 2006. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Ecotoxicology Environmental Safety*, 65, 237–241.
- Gluszczak, L., Miron, D.S., Moraes, B.S., Simões, R.R., Schetinger, M.R.C., Morsch, V.M., Loro, V.L. 2007. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and

- enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Comparative Biochemistry Physiology C*, 146, 519–524.
- Hai, D.Q., Varga, S.I., Matkovics, B. 1997. Organophosphate effects on antioxidant system on carp (*Cyprinus carpio*) and catfish (*Ictalurus nebulosus*). *Comparative Biochemistry Physiology C*, 117, 83–88.
- He, Z.L., Yang, X.E., Stoffella, P.J. 2005. Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology: Organ of Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*, 19, 125–40.
- Heise, K., Puntarulo, S., Nikinmaa, M., Abele, D., Pörtner, H.O. 2006. Oxidative stress during stressful heat exposure and recovery in the North Sea eelpout *Zoarces viviparus*. *The Journal of Experimental Biology*, 209, 353–363.
- Heddle, J.A. 1983. The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity. *Mutation Research–Genetic Toxicology*, 123, 61–118.
- Hu, W., Tedesco, S., McDonagh, B., Sheehan, D. 2010. Shotgun redox proteomics in sub-proteomes trapped on function a lised beads: identification of proteins targeted by oxidative stress. *Marine Environmental Research*, 69, 5–7.
- IBAMA-Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: uma abordagem ambiental. 2010. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/qualidade-ambiental/relatorios-de-agrotoxicos/>. Acesso em: 05 jul. 2011.
- Khan, S.U. 1978. Kinetics of hydrolysis of atrazine in aqueous fulvic acid solution. *Pesticides Science*, 9, 39-43.
- Kaushik, P., Kaushik, G. 2007. An assessment of structure and toxicity correlation in organochlorine pesticides, *Journal of Hazardous Materials*, 143, 102-111.
- Keen, J.H., Habig, W.H., Jakobi, W.B. 1976. Mechanism for the several activities of the glutathione-S-transferases. *Journal of Biological Chemistry*, 251, 6183-6188.
- Kerambrun, E., Sanchez, W., Henry, F., Amara, R. 2011. Are biochemical biomarker responses related to physiological performance of juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) caged in a polluted harbor? *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology and Pharmacology*, 154, 187–195.

- Klobucar, G.I.V., Stambuk, A., Pavlica, M., Peric, M.S., Hackenberger, B.K., Hylland, K. 2010. Genotoxicity monitoring of fresh water environments using caged carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology*, 19, 77–84.
- Kobayashi, H., Suguyama, C., Morikawa, Y., Hayashi, M., Sofuni, T. 1995. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis. *MMS Commun*, 3, 103–115.
- Kolankaya, D. 2006. Organochlorine pesticide residues and their toxic effects on the environment and organisms in Turkey. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 86, 147-160.
- Kurt, P.B., Ozkoc, H.B. 2004. A survey to determine levels of chlorinated pesticides and PCBs in mussels and seawater from the Mid-Black Sea Coast of Turkey. *Marine Pollution Bulletin*, 48, 76–83.
- Lackner, R. 1998. “Oxidative stress” in fish by environmental pollutants. In: Braunbeck, T.; Hinton, D.E.; Streit, B. (ed). *Fish ecotoxicology*. Basel, Switzerland, Birkhäuser Verlag, p. 203-224.
- Langiano, V.C., Martinez, C.B., 2008. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology. C*, 147, 222-231.
- Lavado, R., Urena, R., Martin-Skilton, R., Torreblanca, A., Del Ramo, J., Raldúa, D., Porte, C. 2006. The combined use of chemical and biochemical markers to assess water quality along the Ebro River. *Environmental Pollution*, 139,330–339.
- Levine, R.L., Williams, J.A., Stadtman, E.P., Shacter, E. 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzimology*, 233, 346-357.
- Lombardi, P.E., Peri, S.I., Verrengia Guerrero, N.R. 2010. Trace metal levels in *Prochilodus lineatus* collected from the La Plata River, Argentina. *Water Air Soil Pollution*, 160, 47–59.
- Lushchak, V.I., Bagnyukova, T.V., 2006. Effects of different environmental oxygen levels on free radical processes in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology. B*, 144, 283–289.
- Lushchak, O.V., Kubrak, O.I., Storey, J.M., Storey, K.B., Lushchak, V.I. 2009. Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. *Chemosphere*, 76, 932–937.

- Lushchak, V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, 101, 13–30.
- Meagher, E.A., Fitzgerald, G.A. 2000. Indices of lipid peroxidation in vivo: Strengths and limitation. *Free Radical Biology & Medicine*, 28, 1745-1750.
- Meli, G., Bagnati, R., Fanelli, R., Benfenatti, E., Airoidi, L. 1992. Metabolic profile of atrazine and nitroso atrazine in rat urine. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 48, 701-708.
- Modesto, K.A., Martinez, C.B.R. 2010. Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere*, 81, 781–787.
- Modesto, K.A., Martinez, C.B.R. 2010. Roundup causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere*, 78, 294-299.
- Monteiro, D.A., Rantin, F.T., Kalinin, A.L. 2009. 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). *Comparative Biochemistry Physiology C*, 149, 40–49.
- Mouneyrac, C., Amiard-Triquet, C. 2013. Biomarkers of ecological relevance. In: Féraud, J., Claise, C. (ed) *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*. Springer, Berlin, pp. 210-219.
- Neuparth, T., Bickham, J.W., Theodorakis, C.W., Costa, F.O., Costa, M.H. 2006. Endosulfan-Induced Genotoxicity Detected in the Gilthead Seabream, *Sparus aurata* L., by Means of Flow Cytometry and Micronuclei Assays. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 76, 242-248
- Niencheski, L.F., Fillmann, G. 2006. Contaminantes: Metais, Hidrocarbonetos e Organoclorados. In.: Lana, P.C., Bianchini, A., Ribeiro, C.A.O., Niencheski, L.F.H., Fillmann, G., Santos, C.S.G. (ed.). *Avaliação Ambiental de Estuários Brasileiros: Diretrizes Metodológicas*. Museu Nacional, Rio de Janeiro, pp. 63-118.
- Numan, I.T. 1990. Endrin-induced depletion of glutathione and inhibition of glutathione peroxidase activity in rats. *General Pharmacology*, 21, 625–28.
- Nwani, C.D., Nagpure, N.S., Kumar, R., Kushwaha, B., Kumar, P., Lakra, W.S. 2011. Mutagenic and genotoxic assessment of atrazine-based herbicide to freshwater

- fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus test and single cell gel electrophoresis. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 31, 314-322.
- Oikari, A. 2006. Caging techniques for field exposures of fish to chemical contaminants. *Aquatic Toxicology*, 78, 370–381.
- Oruc, E. O., Sevgiler, Y., & Uner, N. 2004. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 137, 43-51.
- Pandey, S., Nagpure, N.S., Kumar, R., Sharma, S., Srivastava, S.K., Verma, M.S. 2006. Genotoxicity evaluation of acute doses of endosulfan to freshwater teleost *Channa punctatus* (Bloch) by alkaline single-cell gel electrophoresis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 65, 56–61.
- Parma, M.J., Loteste, A., Campana, M., Bacchetta, C. 2007. Changes of hematological parameters in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae) exposed to sublethal concentration of cypermethrin. *Journal of Environmental Biology*, 28, 147–149.
- Parvez, S., Raisuddin, S. 2006. Effects of paraquat on the freshwater fish *Channa punctate* (Bloch): non-enzymatic antioxidants as biomarkers of exposure. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 50, 392–397.
- Paulino, M. G., Souza, N.E.S., Fernandes, M.N. 2012. Subchronic exposure to atrazine induces biochemical and histopathological changes in the gills of a Neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 80, 6-13.
- Payne, J. F., Mathieu, A., Melvin, W., Fancey, L.L. 1996. Acetylcholinesterase, an Old Biomarker with a New Future? Field Trials in Association with Two Urban Rivers and a Paper Mill in Newfoundland. *Marine Pollution Bulletin*, 32, 225-231.
- Pena-Llopis, S., Ferrando, M.D. 2003. Increased recovery of brain acetylcholinesterase activity in dichlorvos-intoxicated European eels *Anguilla anguilla* by bath treatment with N-acetylcysteine. *Diseases of Aquatic Organisms*, 55, 237–245.
- Pena-Llopis, S., Pena, J.B., Sancho, E., Fernandez-Vega, C., Ferrando, M.D., 2001. Glutathione-dependent resistance of the European eel *Anguilla anguilla* to the herbicide molinate. *Chemosphere*, 45, 671–681.

- Pessoa, P.C., Luchmann, K.H., Ribeiro, A.B., Veras, M.M., Correa, J.R.M.B., Nogueira, A.J., Bairy, A.C.D., Carvalho, P.S.M. 2011. Cholinesterase inhibition and behavioral toxicity of carbofuran on *Oreochromis niloticus* early life stages. *Aquatic Toxicology*, 105, 312-320.
- Piner, P., Sevgiler, Y., Uner, N. 2007. In vivo effects of fenthion on oxidative processes by the modulation of glutathione metabolism in the brain of *Oreochromis niloticus*. *Environmental Toxicology*, 22, 605–612.
- Ramsdorf, W.A., Guimarães, F.S.F., Ferraro, M.V.M., Gabardo, J., Trindade, E.S., Cestari, M.M. 2009 Establishment of experimental conditions for preserving samples of fish blood for analysis with both comet assay and flow cytometry. *Mutation Research*, 673, 78-81.
- Ramsdorf, W.A., Vicari, T.A., Almeida, M.I.M., Artoni, B.F., Cestari, M.M. 2012. Handling of *Astyanax sp.* for biomonitoring in Cangüiri Farm within a fountainhead (Iraí River Environment Preservation Area) through the use of genetic biomarkers. *Environmental Monitoring and Assessment*, 184, 5841-5849.
- Rossi, S.C., Silva, M.D., Piancini, L.D., Ribeiro, C.A.O., Cestari, M.M., Assis, H. C.S. 2011. Sublethal Effects of Waterborne Herbicides in Tropical Freshwater Fish. *Bulletin Environmental Contamination Toxicology*, 87 603-607.
- Salaberria, I., Hansen, B.H., Asensio, V., Olsvik, P.A., Andersen, R.A., Jenssen, B.M. 2009. Effects of atrazine on hepatic metabolism and endocrine homeostasis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicology and Applied Pharmacology*, 234, 98–106.
- Sanchez, W., Burgeot, T., Porcher, J. 2013. A novel “Integrated Biomarker Response” calculation based on reference deviation concept. *Environmental Science Pollution Research*, 20, 2721-2725.
- Santos, T.G., Martinez, C.B.R. 2012. Atrazine promotes biochemical changes and DNA damage in a Neotropical fish species. *Chemosphere*, 89, 1118-1125.
- Schlenk, D., Handy, R., Steinert S., Depledge, M., Benson, W. 2008. Biomarkers. In: Di Giulio, R.T., Hinton D.E. (ed). *The Toxicology of Fishes*. CRC Press, New York, pp. 683-715.
- Schmid, W. 1975. The micronucleus test. *Mutation Research*, Amsterdam, 31, 9-15.
- Seriani, R., Ranzani-Paiva, M.J.T., Silva-Souza, A.T., Napoleão, S.R. 2011. Hematology, micronuclei and nuclear abnormalities in fishes from São Francisco

- river, Minas Gerais state, Brazil. *Acta Scientiarum of Biological Sciences*, 33, 107-112.
- Shih, T.M., McDonough, J.H. 1997. Neurochemical mechanisms in soman-induced seizures. *Journal of Applied Toxicology: JAT*, 17, 255–264
- Shimizu, N., Itoh, N., Utiyama, H., Wahl, G.M. 1998. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S-phase. *The Journal of Cell Biology*, 140, 1307–1320.
- Simonato, J. D., Fernandes, M. N., Martinez, C. B., 2011. Gasoline effects on biotransformation and antioxidant defenses of the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Ecotoxicology*, 20, 1400-1410.
- Simon-Giavarotti, K.A. 2002. Enhancement of lindane-induced oxidative stress and hepatotoxicity by thyroid hormone is reduced by gadolinium chloride. *Free Radical Research*, 36, 1033–39.
- Singh, N.P., Mccoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L.A. 1988. Single technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175, 184–191.
- Song, S.B., Xu, Y., Zhou, B.S. 2006. Effects of hexachlorobenzene on antioxidant status of liver and brain of common carp (*Cyprinus carpio*). *Chemosphere*, 65, 699–706.
- Stephensen, E., Sturve, J., Förlin, L. 2002. Effects of redox cycling compounds on glutathione content and activity of glutathione-related enzymes in rainbow trout liver. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology and Pharmacology: Comparative Biochemistry and Physiology*, 133, 435–442.
- Thomaz, J.M., Martins, N.D., Monteiro, D.A., Rantin, F.T., Kalinin, A.L. 2009. Cardio-respiratory function and oxidative stress biomarkers in Nile tilapia exposed to the organophosphate insecticide trichlorfon (Neguvon). *Ecotoxicology Environmental Safety*, 72, 1413–1424.
- Troncoso, I.C., Cazenave, J., Bacchetta, C., Bistoni, M.A. 2012. Histopathological changes in the gills and liver of *Prochilodus lineatus* from the Salado River basin (Santa Fe, Argentina). *Fish Physiology and Biochemistry*, 38, 693–702.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M. 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64, 178-89.

- Van Der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13, 57–149.
- Ventura, B.C., Angelis, D.F., Marin-Morales, M.A. 2008. Mutagenic and genotoxic effects of the atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by micronuclei test and the comet assay. *Pesticides Biochemical and Physiology*, 90, 42–51
- Viarengo, A., Burlando, B., Ceratto, N., Panfoli, I., 2000. Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. *Cellular and Molecular Biology*, 46, 407-417.
- Viarengo, A., Ponzano, E., Dondero, F., Fabbri, F. 1997. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: a application to Mediterranean and Antarctic mollusks. *Marine Environmental Research*, 44, 69-84.
- Videla, L.A., Barros, S.B., Junqueira, V.B. 1990. Lindane-induced liver oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 9, 169-179.
- Whyte, J.J., Jung, R.E., Schmitt, C.J., Tillitt, D.E. 2000. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) Activity in Fish as a Biomarker of Chemical Exposure. *Critical Reviews in Toxicology*, 30, 347–570.
- Zanette, J., Monserrat, J.M., Bianchini, A. 2006. Biochemical biomarkers in gills of mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* from three Brazilian estuaries. *Comparative Biochemistry Physiology*, 143, 187-191.

CAPÍTULO III

Manuscrito em preparação para ser submetido ao periódico Environmental
Monitoring and Assessment

Biomarcadores bioquímicos e genéticos em *Astyanax altiparanae* transplantados e residentes em áreas agrícolas: implicações para o biomonitoramento

Resumo

O principal objetivo deste trabalho foi verificar a sensibilidade de respostas de biomarcadores em peixes engaiolados e residentes em áreas agrícolas e a capacidade destas respostas em discriminar os níveis de contaminação em cada local. Exemplares da espécie de peixe neotropical *Astyanax altiparanae* foram confinados por 168 h em três lagoas localizadas em uma região de intensa atividade agrícola, no norte do Paraná e também exemplares da mesma espécie foram coletados nos mesmos locais, durante as semanas de exposição. Os biomarcadores bioquímicos analisados foram as enzimas de biotransformação de fase I e II, como a 7-etoxiresorufina-O-deetilase (EROD) e a glutationa-S-transferase, os níveis hepáticos e branquiais de tióis não-proteicos (NPSH), danos oxidativos, como a lipoperoxidação (LPO), atividade da acetilcolinesterase (AChE) no músculo e cérebro e biomarcadores genéticos, como quebras no DNA e a frequência de micronúcleos e alterações eritrocíticas nucleares. Também foi avaliada a frequência de eritrócitos imaturos (EI). Os resultados indicaram que os biomarcadores altamente sensíveis (tais como danos no DNA e lipoperoxidação) apresentaram resultados semelhantes em peixes transplantados e residentes, e os que refletem o produto de eventos cumulativos (como o teste de micronúcleos [embora não estatisticamente significativo] e alterações eritrocíticas nucleares) têm uma melhor capacidade discriminativa quando aplicado a exemplares cronicamente expostos (nativos). As análises integradas dos biomarcadores em um índice de análise global (IBRv2) demonstraram que a abordagem utilizando peixes engaiolados foi mais efetiva para discriminar os níveis de contaminação de cada local, corroborando os resultados de análises químicas de alguns agrotóxicos, embora a abordagem integrada de biomarcadores em peixes residentes tenha também mostrado um padrão semelhante de resposta, se mostrando também satisfatória para o monitoramento da qualidade destes ambientes. Estes resultados ressaltam a importância da seleção dos biomarcadores e sugerem análises paralelas de peixes “engaiolados” e residentes para uma melhor caracterização da poluição nestas áreas de estudo.

Palavras-chave: *testes in situ*, *biotransformação*, *genotoxicidade*, *estresse oxidativo*, *índice integrado de resposta de biomarcadores*.

3.1 INTRODUÇÃO

O processo de expansão agrícola do Brasil, relacionado com o aumento populacional e o importante papel exercido pelo país na produção agrícola mundial (IBAMA, 2010) trouxe como consequência um crescimento de 190% do mercado interno de agrotóxicos, apenas na última década, fazendo do país o recordista mundial no consumo destes produtos (SINDAG, 2009). Entre os anos de 2010 e 2011 foram utilizados cerca de 936 mil toneladas de agrotóxicos em todo o território nacional (ANVISA & UFPR, 2012). O estado do Paraná, por sua vez, destaca-se no cenário agrícola brasileiro, ocupando o terceiro lugar no ranking nacional de consumo de agrotóxicos, o que equivale a 13% do total vendido no país (ANVISA & UFPR, 2012).

A poluição ambiental causada por estes agrotóxicos, especialmente em ecossistemas aquáticos, tem sido documentada no mundo inteiro e constitui um grande problema tanto local como global (Cerejeira et al., 2003; Spalding et al., 2003). Entretanto, trabalhos de campo que demonstrem os efeitos destes contaminantes sobre a fauna aquática são escassos, e os efeitos da redução da mata ciliar e do uso da paisagem adjacente sobre a qualidade dos recursos hídricos e saúde da biota aquática têm sido pouco investigados.

Para monitorar os efeitos dos agrotóxicos no ambiente, os testes *in situ* têm se mostrado úteis, principalmente porque integram relevância ecológica aos testes de toxicidade, através da incorporação de flutuações de campo, dentro de condições semi-controladas. Os peixes têm sido amplamente empregados em testes *in situ*, pois o confinamento constitui uma estratégia útil no monitoramento de agentes tóxicos no ambiente aquático (Barbee et al., 2008; Schlenk et al., 2008; Klobucar et al., 2010), por meio da análise de diferentes parâmetros. No Brasil, ainda são poucos os trabalhos focando o uso de biomarcadores em espécies de peixe nativas como ferramentas para avaliação da qualidade da água (Wilhelm-Filho et al., 2001; Winkaler et al., 2001; Akaishi et al., 2004; Ramsdorf et al., 2009). O confinamento *in situ* de peixes facilita a investigação de áreas onde espécimes nativas são de difícil captura ou de baixa ocorrência, e reduzem a influência de diferenças genéticas e fenômenos adaptativos, que podem atenuar a capacidade do biomonitoramento

em discriminar diferentes níveis de distúrbios ambientais (Regoli e Principato, 1995). Desta maneira, na escolha dos organismos em testes toxicológicos, estes fatos devem ser levados em consideração e os resultados cautelosamente avaliados.

Espécies do gênero *Astyanax*, têm sido apontadas como espécies úteis no monitoramento ambiental em vários trabalhos em campo (Schultz e Martins-Junior, 2000; Winkaler et al., 2001; Silva & Martinez, 2007; Lemos et al., 2008) e laboratório (Akaishi et al., 2004; Rossi et al., 2011). O peixe *Astyanax altiparanae* (Garutti e Britski, 2000), conhecido popularmente como lambari-do-rabo-amarelo, é importante na pesca amadora e alimentação humana e encontrado com grande abundância na bacia do rio Paranapanema, da qual faz parte o rio Tibagi e seus afluentes, o que provavelmente ressalta a importância desta espécie para o sistema ecológico (Shibatta et al., 2002; Orsi et al., 2002).

O principal objetivo deste trabalho foi comparar a sensibilidade de peixes da espécie *A. altiparanae* confinados *in situ* (agudamente expostos) e residentes (cronicamente expostos) em corpos d'água de áreas agrícolas, com base em respostas de biomarcadores bioquímicos e genotóxicos, visando também contribuir para a seleção e indicação destes organismos a programas de monitoramento ambiental.

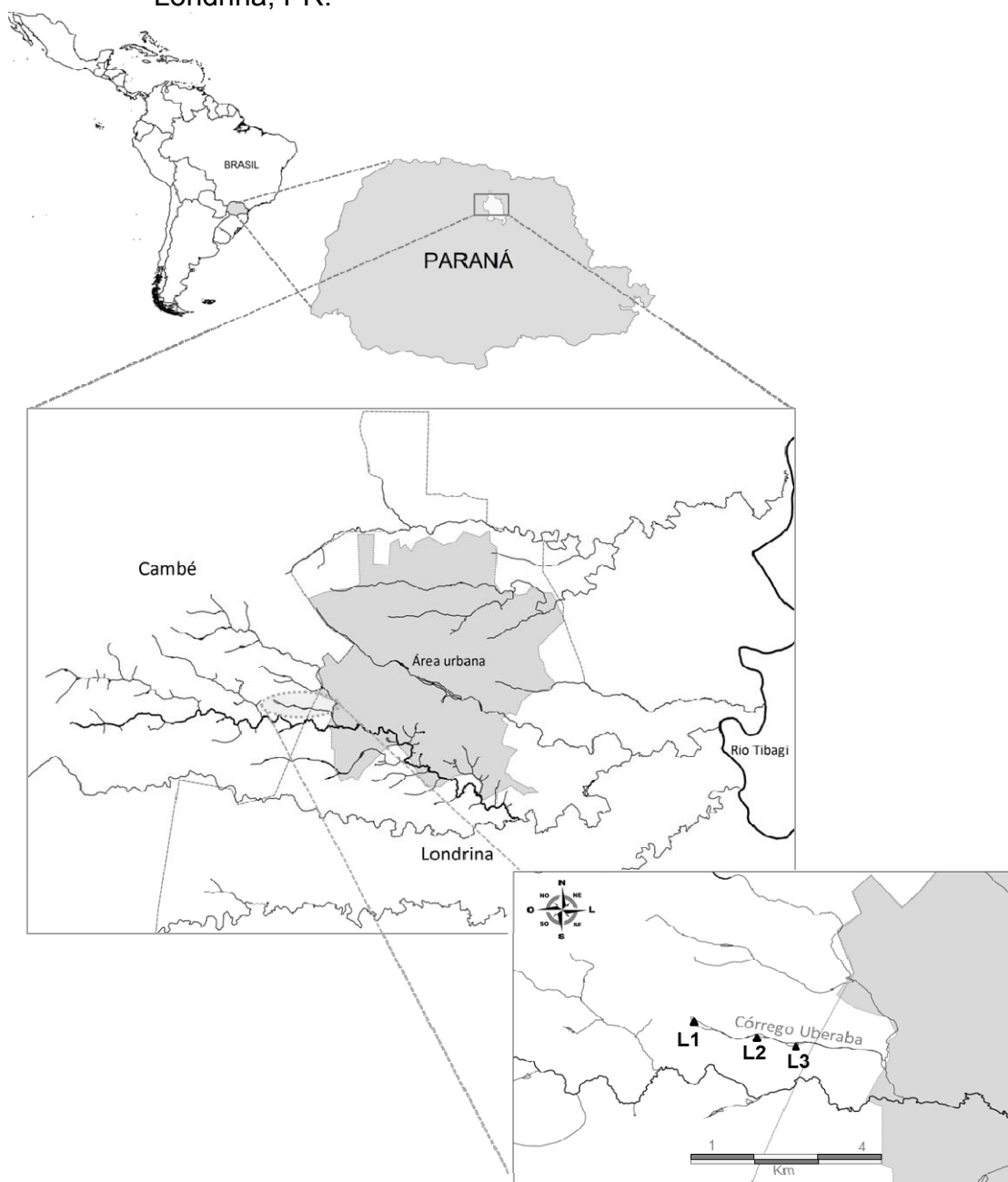
3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Área de Estudo

O ribeirão avaliado no presente trabalho, denominado Uberaba faz parte da microbacia do ribeirão Cafezal. A bacia do ribeirão Cafezal é o segundo principal sistema de captação de água que abastece o município de Londrina. Esta região caracteriza-se pela intensa atividade agrícola, com predominância de monoculturas não perenes e emprego de mecanização maciça, insumos e agrotóxicos, que podem provocar a contaminação dos solos e das águas subterrâneas e superficiais. Foram delimitados três pontos ao longo do ribeirão Uberaba (L1, L2 e L3), localizados em represamentos artificiais, na porção alta, média e baixa do ribeirão (Fig.3.1). Durante

o período dos experimentos, houve a transição de monoculturas de milho para cultivos de soja, com registro de aplicação de herbicidas de diferentes herbicidas, como compostos formulados a base de glifosato e triazínicos.

Figura 4.1 – Localização dos pontos experimentais: Lagoa 1 (L1), Lagoa (L2) e Lagoa 3 (L3) ao longo do córrego Uberaba, bacia do ribeirão Cafezal, Londrina, PR.



Fonte: o autor.

3.2.2 Organismos-Teste e Delineamento Experimental

Exemplares de peixes da espécie *A. altiparanae* ($5,63 \pm 0,26\text{g}$; $7,48 \pm 0,10$ cm) foram obtidos de uma piscicultura da região e utilizados para os testes *in situ*. Os testes *in situ* foram realizados em semanas diferentes, entre os meses de maio/junho de 2013. Antes do início de cada teste, os peixes recém- chegados da piscicultura foram aclimatados em laboratório, em caixas d'água de 500 L contendo água limpa e desclorada, com aeração constante, por um período de sete dias. Após o período de aclimação, 10 animais (em cada semana de exposição) foram amostrados no próprio local, sendo que as respostas obtidas com os biomarcadores analisados nestes animais foram utilizadas para determinar os valores basais dos parâmetros biológicos (tempo inicial ou T_0), sendo que estas respostas foram utilizadas para o cálculo do Índice Integrado de Resposta de Biomarcadores (IBRv2).

Após aclimação, o restante dos peixes foi transportado para o campo em sacos plásticos contendo água com injeção de oxigênio. Os animais foram confinados em uma gaiola retangular ($n = 20$ por gaiola) ($60 \times 50 \times 40$ cm; 120 L) confeccionada de estrutura metálica e revestida com malha plástica de 5 mm, em cada ponto experimental por um período de 168 h (1 semana). As gaiolas foram completamente imersas (profundidade $\leq 1,5$ m), ficando em contato com o sedimento e ficaram firmemente ancoradas nos locais para impedir o seu deslocamento.

Durante a semana de permanência das gaiolas nos pontos experimentais, exemplares de *A. altiparanae* foram coletados nas lagoas, com o auxílio de peneiras e tarrafas. Os peixes coletados foram rapidamente levados para o laboratório, onde passaram pelos mesmos procedimentos amostrais adotados para os peixes confinados *in situ*. Durante a exposição em campo, parâmetros físicos e químicos da água (pH, condutividade, temperatura e oxigênio dissolvido) foram mensurados no primeiro e último dia dos testes *in situ*.

3.2.3 Análises de Agrotóxicos na Água e Sedimentos

A fim de caracterizar o ribeirão quanto à presença de alguns agrotóxicos, amostras de águas superficiais e sedimentos foram coletadas de cada lagoa ao final dos experimentos *in situ* e enviadas ao Laboratório de Microcontaminantes

Orgânicos e Ecotoxicologia, da Universidade Federal de Rio Grande (CONECO-FURG), onde se realizou a quantificação de inseticidas organoclorados e alguns herbicidas como a trifluralina, glifosato, atrazina, ametrina, simazina, irgarol e clomazone.

Para organoclorados, seguiu-se a metodologia descrita por Niencheski e Fillmann (2006). A identificação e quantificação de compostos organoclorados foi realizado em um cromatógrafo de fase gasosa (Perkin Elmer Clarus 500) equipado com detector de captura de elétrons ^{63}Ni (ECD) e um injetor automático de amostra. Os agrotóxicos clorados analisados foram alfa-HCH (hexaclorociclohexano), beta-HCH, gama-HCH, delta-HCH, hexaclorobenzeno, diclorodifeniltricloroetano (somatório dos isômeros p,p'- e o,p-DDT), diclorodifenildicloroetileno (somatório dos isômeros p,p'- e o,p-DDE), diclorodifenildicloroetano (somatório dos isômeros p,p'- e o,p-DDD), aldrim, dieldrin, endrin, alfa-clordano, gama-clordano, transnonaclor, clortalonil, oxiclordano, heptacloro, heptacloro epóxido, diclofluanida, endosulfan (I, II e sulfato), metoxiclor e mirex. A identificação dos compostos clorados foi baseada em espectros de massa individual e tempos de retenção no cromatógrafo em comparação com dados da literatura, dados da biblioteca e padrões autênticos. Padrões (2,4,5,6 -tetra-cloro-m-xileno [TCMX] e PCB 209) foram injetados e analisados sob as mesmas condições que as amostras. A recuperação foi avaliada usando os PCBs 103 e 198 como padrões de recuperação e o desempenho analítico foi avaliado através da análise de materiais de referência certificados e brancos analíticos. A confirmação de alguns compostos foi feita através da análise em um cromatógrafo a gás (Perkin Elmer Clarus 500) com espectrometria de massa (GC - MS).

3.2.4 Amostragem

Após o período de exposição, os peixes foram retirados das gaiolas e rapidamente transportados para o laboratório. Os peixes coletados também foram imediatamente levados ao laboratório (~20 min de tempo de transporte). Os animais foram mantidos em caixas plásticas contendo água do próprio local de origem, até o momento de serem sacrificados. Inicialmente, os animais foram anestesiados com

benzocaína ($0,1 \text{ g L}^{-1}$ de água), medidos e pesados e tiveram amostras de sangue retiradas a partir da veia caudal. Alíquotas de sangue foram colocadas em tubos plásticos contendo soro bovino fetal, mantidos em gelo e em proteção da luz, para a realização do teste do cometa. Com alíquotas do sangue, também foram confeccionadas extensões sanguíneas para análises citológicas. Fígado, brânquias, cérebro e músculo foram retirados e armazenados em ultra-freezer a -80°C , até o momento das análises bioquímicas.

3.2.5 Análises Bioquímicas

As amostras de fígado e brânquia foram pesadas, homogeneizadas (1:10 m/v) em tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7,0) e centrifugadas (10.000 g, 20 min, 4°C). O sobrenadante foi utilizado para análises dos biomarcadores bioquímicos.

3.2.5.1 *Etoxiresorufina-O-deetilase (EROD)*

A atividade da CYP1A foi determinada por meio da atividade da EROD, estimada pela taxa de conversão da 7-Etoxiresorufina em resorufina, seguindo-se o protocolo de Eggens e Galgani (1992), com algumas modificações. A reação foi iniciada pela adição da amostra na mistura reativa (tampão fosfato de K 0,1M; pH 7,6: NADPH 2 mM e 0,1 mM 7-Etoxiresorufina). O aumento progressivo da fluorescência, resultante da formação de resorufina, foi medido a cada minuto, durante 10 minutos (ex/em: 530/590nm). A atividade da EROD foi expressa em pmol de resorufina $\text{minuto}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$, baseada em uma curva padrão de resorufina.

3.2.5.2 *Glutathione-S-transferase (GST)*

A atividade da glutathione-S-transferase (GST) foi determinada pelo monitoramento da complexação da glutathione reduzida (GSH) com o substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) em espectrofotômetro a 340 nm, de acordo com o método descrito por Keen et al. (1976). O aumento de CDBN conjugado foi monitorado durante 1 minuto, em espectrofotômetro a 340 nm e a atividade da enzima foi expressa em nmol de CDBN conjugado min^{-1} mg de proteína⁻¹.

3.2.5.3 *Tióis não proteicos (NPSH)*

A concentração de tióis não proteicos nos tecidos foi determinada de acordo com o método de Beutler et al. (1963) através da reação dos grupamentos -SH com o reagente de cor 5,5-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico (DTNB), formando o tiolato (TNB) que foi quantificado em 412 nm. A concentração de tióis não proteicos foi expressa em μg NPSH. mg proteína⁻¹.

3.2.5.4 *Lipoperoxidação (LPO)*

Para a medida da lipoperoxidação (LPO) foi utilizado o ensaio TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, entre elas o malondialdeído [MDA] que é um dos subprodutos finais da LPO) de acordo o protocolo descrito por Camejo et al. (1998). Ao sobrenadante foi acrescentado butilhidroxitolueno (BHT 1M), solução salina fosfatada (2 mM KCl; 1,4 mM NaH_2PO_4 ; 357 mM NaCl; 10 mM Na_2HPO_4 ; pH 7,4), ácido tricloroacético (TCA 50%) e ácido tiobarbitúrico (TBA 1,3%) dissolvido em 0,3% NaOH e a mistura foi mantida a 60°C em estufa por 1 hora. Posteriormente, foi feita a leitura de fluorescência (ex/em: 535/590 nm) e a concentração de TBARS determinada através de uma curva padrão de malondialdeído (MDA). A concentração de TBARS foi expressa em nmol de TBARS mg de proteína⁻¹.

3.2.5.5 Acetilcolinesterase (AChE)

Amostras de tecido cerebral e muscular foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio (0,1 M; pH 7,5; 1:10 m/v) e centrifugadas (10.000 g, 20 min, 4 °C) e o sobrenadante foi utilizado para a determinação da atividade da AChE, de acordo com o método de Ellman et al. (1961), adaptado para microplaca por Alves Costa et al. (2007). A quantificação da atividade da AChE ($\text{nmol DTNB} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$) ocorreu a partir da reação do substrato de iodeto de acetilcolina (9 mM) com o reagente de cor contendo DTNB (0,5 mM). A tiocolina, produto da degradação do iodeto de acetilcolina pela AChE reage com o DTNB, formando o nitrobenzoato, um ânion amarelado. As leituras da variação da absorbância da solução, durante 6 minutos, foram feitas por espectrofotometria a 415 nm e a atividade da AChE foi expressa em $\text{nmol min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$.

3.2.5.6 Proteínas totais

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976), que se baseia na reação de proteínas com o corante Coomassie Brilliant Blue G-250. A curva de calibração foi feita com albumina de soro bovino (BSA) e a absorbância lida em espectrofotômetro a 595 nm.

3.2.6 Análises genotóxicas

O ensaio alcalino do cometa com eritrócitos foi realizado de acordo com Singh et al. (1988), com algumas modificações descritas por Ramsdorf et al. (2009). Apenas as amostras de sangue que apresentaram viabilidade celular superior a 80%, determinada pelo método de exclusão por azul de Trypan, foram utilizadas no ensaio do cometa.

Após a amostragem, uma alíquota de sangue misturado com soro bovino fetal (1:100) foi adicionada a agarose de baixo ponto de fusão. Esta mistura foi colocada em lâmina de vidro previamente coberta com agarose normal, coberta com lamínula,

e permaneceu na geladeira por 30 min. Em seguida as lâminas foram retiradas e as lâminas foram submetidas às seguintes etapas: a) lise: 1h, a 4°C, protegido da luz, em solução de lise (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, DMSO 10%, Triton X-100 1 mL, pH 10,0); b) desnaturação do DNA: 30 min, no escuro, em um tampão de eletroforese (NaOH 0,3 N, EDTA 1 mM, pH > 13); c) eletroforese: 20 min, 300 mA, 25 V, 1 V cm⁻¹ e d) neutralização: três lavadas por 5 min cada com tampão (0,4 M Tris, pH 7,5). As lâminas foram então fixadas com etanol absoluto por 10 min e acondicionadas em geladeira até o momento de serem analisadas.

Posteriormente, as lâminas foram coradas com gelRed (Uniscience®) e analisadas em microscópio Leica (DM 2500) adaptado para fluorescência/epifluorescência, equipado com filtro de excitação azul (450-490 nm) e um filtro de barreira de 515 nm com magnificação de 1000X. Todas as lâminas foram analisadas em teste-cego, sendo avaliados 100 nucleóides por peixe. A extensão dos danos no DNA foi quantificada pelo comprimento da cauda formada pela migração dos fragmentos de DNA, sendo classificados em quatro classes de acordo com Kobayashi et al. (1995): classe 0 = sem dano aparente; classe 1 = cauda curta menor que o diâmetro do núcleo; classe 2 = comprimento da cauda correspondendo a uma ou duas vezes o diâmetro do núcleo; classe 3 = comprimento da cauda maior que o dobro do diâmetro do núcleo. O escore de danos no DNA foi obtido pela multiplicação pelo número de células em cada classe pelo valor da classe. Os resultados de danos no DNA foram expressos pela média dos escores de danos de cada grupo, em cada local de exposição.

O teste do micronúcleo (MN) e de alterações eritrocíticas nucleares (ENA) com coloração fluorescente de laranja de acridina (LA) foram realizados de acordo com a técnica descrita por Ueda et al. (1992), com algumas modificações. Uma pequena gota de sangue foi misturada na própria lâmina com soro bovino fetal (1:1) e foi realizada uma extensão sanguínea. As lâminas secaram *overnight* e foram então fixadas com metanol por 10 min. No momento da análise, cada lâmina foi corada com 20 µL de laranja de acridina (0,003%) e analisadas imediatamente em microscópio de epifluorescência, em aumento de 1000X. Para cada peixe, foram analisadas 3000 células, sendo avaliada a presença de MN e alterações na forma elíptica normal dos núcleos das hemácias que não se enquadraram no conceito de micronúcleo, sendo descritas como alterações eritrocíticas nucleares (AENS)

(Carrasco et al., 1990). As AENS foram classificadas em três categorias: núcleo segmentado, núcleo lobulado e núcleo em forma de rim, além da presença de células binucleadas.

A identificação de eritrócitos imaturos foi realizada segundo Çavas e Ergene-Gözükara (2005). A laranja de acridina cora seletivamente eritrócitos imaturos ou policromáticos. Sob microscópio fluorescente, micronúcleos e os principais núcleos apresentam forte fluorescência verde-amarelo e entre todas as células os eritrócitos imaturos podem ser facilmente identificados pelo seu conteúdo de RNA citoplasmático, apresentando fluorescência vermelha no citoplasma.

3.2.7 Índice Integrado de Resposta de Biomarcadores (IBR)

Os biomarcadores descritos na seção acima foram aplicados em um índice chamado de “Índice Integrado de Resposta de Biomarcadores” (IBR) descrito por Sanchez et al. (2013). Os valores de IBR foram calculados isoladamente para os peixes confinados *in situ* e residentes em cada local. Para o cálculo, a razão dos locais experimentais individualmente e grupos iniciais (T_0) para cada biomarcador foi logaritmizada (Y_i) e posteriormente calculada a média (μ) e o desvio padrão (s) gerais para cada parâmetro. Em seguida, os valores de Y_i foram padronizados através da fórmula: $Z_i = (Y_i - \mu)/s$ e a diferença entre Z_i e Z_0 (T_0) determinaram os valores de A . Por fim, o IBR foi calculado para cada local de exposição, por meio da somatória dos valores de A de cada biomarcador.

Em cada local, os parâmetros foram representados em um gráfico de radar, indicando o desvio do biomarcador investigado com relação ao tempo inicial (0). A área superior a 0 reflete indução do biomarcador, e menor que 0 indica diminuição do biomarcador.

3.2.8 Análises Estatísticas

Os dados dos biomarcadores foram testados quanto à normalidade e homogeneidade de variância usando o teste de Shapiro Wilks e de Levene, respectivamente. Os resultados obtidos com os biomarcadores analisados nos peixes submetidos aos testes *in situ* e coletados nos três pontos experimentais foram comparados entre si através de análise de variância paramétrica ou não-paramétrica (ANOVA ou Kruskal-Wallis), isoladamente (*in situ* e residentes), de acordo com a distribuição dos dados (normalidade e homogeneidade da variância) seguida por um teste de comparações múltiplas quando indicado. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$. Por fim, os dados apresentados nos gráficos representam a média \pm erro padrão.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Biometria dos Peixes

Os dados biométricos dos peixes são apresentados na Tabela 3.1. De maneira geral, os peixes residentes nas três lagoas (L1, L2 e L3) apresentaram maiores variações de tamanho com relação aos demais grupos. Já os peixes utilizados nos experimentos *in situ* apresentaram uma maior homogeneidade com relação ao tamanho.

Tabela 3.1- Dados biométricos em *A.altiparanae* utilizados nos experimentos *in situ* e coletados em diferentes lagoas (L1, L2 e L3) ao longo do córrego Uberaba.

	<i>n</i>	Peso (g)	Comprimento (cm)
Grupo inicial (T ₀)	30	5,3 ± 0,5 (2,1 - 12,4)	7,7 ± 0,2 (5,7– 10,0)
Residente L1	6	1,1 ± 0,2 (0,6– 2,0)	4,4 ± 0,3 (3,8 - 5,7)
Residente L2	12	7,3 ± 0,8 (2,0 -11,2)	8,4 ± 0,3 (5,5 – 10,0)
Residente L3	8	2,9 ± 0,8 (0,8 - 8,5)	6,0 ± 0,5 (4,1 – 9,0)
<i>In situ</i> L1	14	6,3 ± 0,4 (4,6 - 8,0)	7,8 ± 0,1 (7,3 - 8,5)
<i>In situ</i> L2	14	5,8 ± 0,4 (5,3 - 8,9)	7,5 ± 0,2 (5,5 - 8,5)
<i>In situ</i> L3	14	5,3 ± 0,4 (3,6 - 9,3)	7,5 ± 0,1 (6,5 – 9,0)

Os valores representam a média± EP de cada grupo e o intervalo de tamanho.

3.3.2 Parâmetros Físicos e Químicos da Água e Análises de Agrotóxicos

Os valores dos parâmetros físicos e químicos da água (Tabela 3.2) não apresentaram grandes variações entre os locais avaliados, com exceção dos valores de oxigênio dissolvido observados na lagoa 1, que foram inferiores aos dos outros locais. Por se tratar de um represamento artificial, logo na nascente do ribeirão este ambiente apresenta fluxo muito lento da água, o que pode estar relacionado com as baixas concentrações de OD. Além disso, nota-se neste ambiente grande quantidade de material orgânico em decomposição, além de ser, entre as três lagoas, o ambiente mais susceptível à entrada de fertilizantes químicos advindos das áreas agrícolas do entorno, podendo este local estar em início do processo de eutrofização.

Dos 35 compostos que foram avaliados nos sedimentos das três lagoas (Tabela 3.3), foram detectados acima dos limites de confiabilidade 10 compostos, dentre eles os herbicidas atrazina, simazina e trifluralina, e os inseticidas organoclorados hexaclorociclohexanos (*a* e *b*-HCH), hexaclorobenzeno (HCB), heptacloro, diclorodifeniltricloroetano (*pp*-DDT), dieldrin e endosulfan II. Entre os 10 agrotóxicos detectados nas amostras ambientais, na lagoa 1 (L1) foram encontradas as maiores concentrações de 6 destes compostos, indicando um provável gradiente de contaminação no sentido nascente→foz do ribeirão (L1>L2>L3). Os herbicidas

atrazina e ametrina foram detectados em amostras de água, onde as maiores concentrações também puderam ser observadas na lagoa 1 (L1).

Tabela 3.2- Parâmetros físicos e químicos da água durante os experimentos.

Variáveis da água	Tanques de aclimação (T ₀)	L1	L2	L3
Temperatura (°C)	20,55 ± 1,36	22,15 – 19,46	20,13-19,57	20,8-20,5
pH	6,82 ± 0,23	5,47– 5,61	5,81-6,25	6,8-6,08
Oxigênio diss.(mgO ₂ .L ⁻¹)	7,54 ± 0,87	5,55-4,8	6,87-6,41	8,4-8,81
Condutividade (µS.cm ⁻¹)	83 ± 11,0	33-34	41-37	43-51
Dureza (mg CaCO ₃ .L ⁻¹)	57,8 ± 3,2	36	38	38

Os valores dos parâmetros obtidos nos tanques de aclimação (T₀) dos animais nas diferentes semanas foram agrupados e estão representados pela média ± EP. Nas lagoas 1, 2 e 3 estão representados os valores obtidos no primeiro e último dia de exposição dos peixes (separados por hífen).

Tabela 3.3 – Concentrações de alguns agrotóxicos analisados na água e sedimento das Lagoas 1, 2 e 3.

	Composto	Sedimento ($\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$)			Água ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)		
		L1	L2	L3	L1	L2	L3
H	<i>Atrazina</i>	0,471	0,336	0,272	0,310	0,130	0,130
H	<i>Glifosato</i>	< LQM	< LQM	< LQM	nd	nd	nd
H	<i>Irgarol</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd
H	<i>Simazina</i>	0,597	0,419	0,486	<LQM	<LQM	<LQM
H	<i>Ametrina</i>	< LQM	< LQM	< LQM	0,666	0,397	0,399
H	<i>Clomazone</i>	< LQM	< LQM	< LQM	nd	nd	nd
H	<i>Trifluralina</i>	3,710	2,918	1,967	-	-	-
I	<i>α-HCH</i>	5,130	3,198	1,000	-	-	-
I	<i>β-HCH</i>	1,230	0,970	0,829	-	-	-
I	<i>γ-HCH</i>	< LQM	< LQM	< LQM	-	-	-
I	<i>δ-HCH</i>	< LQM	< LQM	< LQM	-	-	-
I	<i>HCB</i>	2,180	2,197	2,194	-	-	-
I	<i>Clortalonil</i>	< LQM	< LQM	< LQM	-	-	-
I	<i>Oxiclordano</i>	< LQM	< LQM	< LQM	-	-	-
I	<i>Hepatcloro</i>	0,060	0,052	< LQM	-	-	-
I	<i>Heptacloro hepóxido</i>	< LQM	< LQM	< LQM	-	-	-
I	<i>Diclofluanida</i>	< LQM	< LQM	< LQM	-	-	-
I	<i>Transnonaclor</i>	nd	nd	nd	-	-	-
I	<i>α-clordano</i>	nd	nd	nd	-	-	-
I	<i>γ-clordano</i>	< LQM	< LQM	< LQM	-	-	-
I	<i>op-DDD</i>	< LQM	< LQM	< LQM	-	-	-
I	<i>ppDDD</i>	nd	nd	nd	-	-	-
I	<i>op-DDE</i>	< LQM	< LQM	< LQM	-	-	-
I	<i>pp-DDE</i>	nd	nd	nd	-	-	-
I	<i>op-DDT</i>	nd	nd	nd	-	-	-
I	<i>ppDDT</i>	0,021	0,022	0,003	-	-	-
I	<i>Aldrim</i>	< LQM	< LQM	< LQM	-	-	-
I	<i>Endrim</i>	nd	nd	nd	-	-	-
I	<i>Endrim aldeído</i>	nd	nd	nd	-	-	-
I	<i>Endrim cetona</i>	0,008	-	0,003	-	-	-
I	<i>Dildren</i>	0,056	0,078	0,032	-	-	-
I	<i>Endosulfan I</i>	nd	nd	nd	-	-	-
I	<i>Endosulfan II</i>	0,001	0,004	< LQM	-	-	-
I	<i>Endosulfan sulfato</i>	nd	nd	nd	-	-	-
I	<i>Metoxiclor</i>	nd	nd	nd	-	-	-
I	<i>Mirex</i>	nd	nd	nd	-	-	-

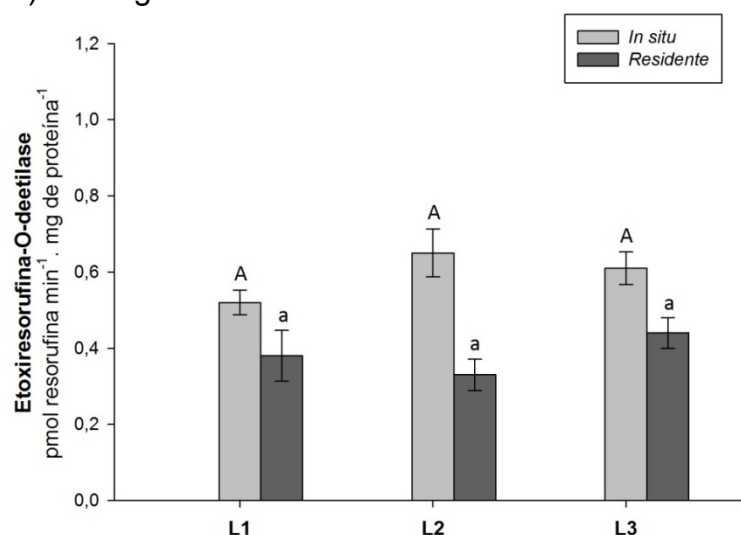
H= herbicida; I= inseticida; LQM= abaixo de limite de detecção confiável (0,0006); nd= não detectado.

3.3.3 Biomarcadores

Etoxiresorufina-O-deetilase (EROD)

Os resultados da atividade da EROD no fígado dos peixes estão apresentados na Fig. 3.2. Nas brânquias a atividade enzimática da EROD não foi detectada pelo método utilizado. No fígado não foi observada nenhuma alteração significativa na atividade enzimática entre os lambaris confinados e coletados nas três lagoas.

Figura 3.2– Atividade da 7-Etoxiresorufina O-deetilase em fígado de *A. altiparanae* submetidos a testes *in situ* e coletados nas lagoas 1 (L1), 2 (L2) e 3 (L3) ao longo do ribeirão Uberaba.



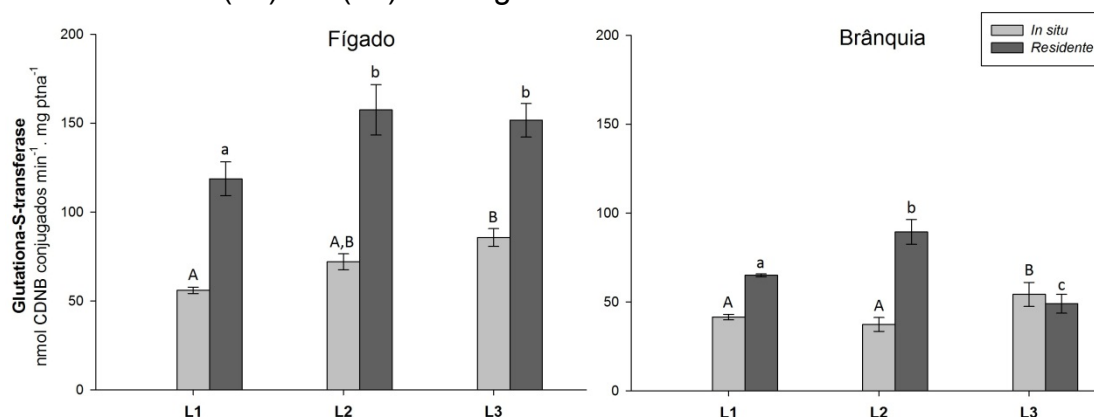
Letras distintas indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$) dentro de cada abordagem experimental.

Glutathiona-S-transferase (GST)

A atividade da GST hepática (Fig. 3.3) apresentou uma diminuição significativa nos peixes expostos na lagoa 1 com relação as demais. Da mesma forma, nos peixes residentes da lagoa 1 também foi observado uma menor atividade da GST no fígado. Nas brânquias (Fig.4.3), foi observado uma diminuição da atividade da GST nos peixes confinados nas lagoas 1e 2 comparada com a

atividade enzimática dos peixes da lagoa 3. O contrario pode ser observado nos peixes residentes nas lagoas 1 e 2, que apresentaram uma maior atividade enzimática na brânquia, comparado com peixes coletados na lagoa 3.

Figura 3.3 – Atividade da Glutaciona-S-transferase em fígado e brânquia de *A. altiparanae* submetidos a testes *in situ* e coletados nas lagoas 1 (L1), 2 (L2) e 3 (L3) ao longo do ribeirão Uberaba.

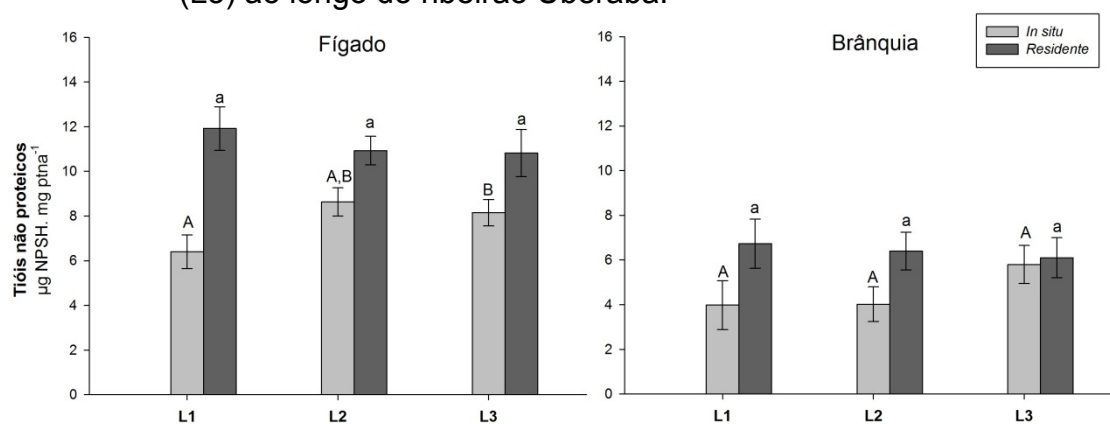


Letras distintas indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$) dentro de cada abordagem experimental.

Tióis não proteicos (NPSH)

O conteúdo de tióis não proteicos (Fig. 3.4) diminui no fígado dos peixes confinados na lagoa 1 quando comparado com os demais grupos. Nos animais residentes, não foram encontradas diferenças significativas na concentração hepática de NPSH. Nas brânquias não foi observada nenhuma alteração significativa no conteúdo de NPSH entre os lambaris confinados e coletados nas três lagoas.

Figura 3.4 – Conteúdo de tióis não proteicos no fígado e brânquia de *A. altiparanae* submetidos a testes *in situ* e coletados nas lagoas 1 (L1), 2 (L2) e 3 (L3) ao longo do ribeirão Uberaba.

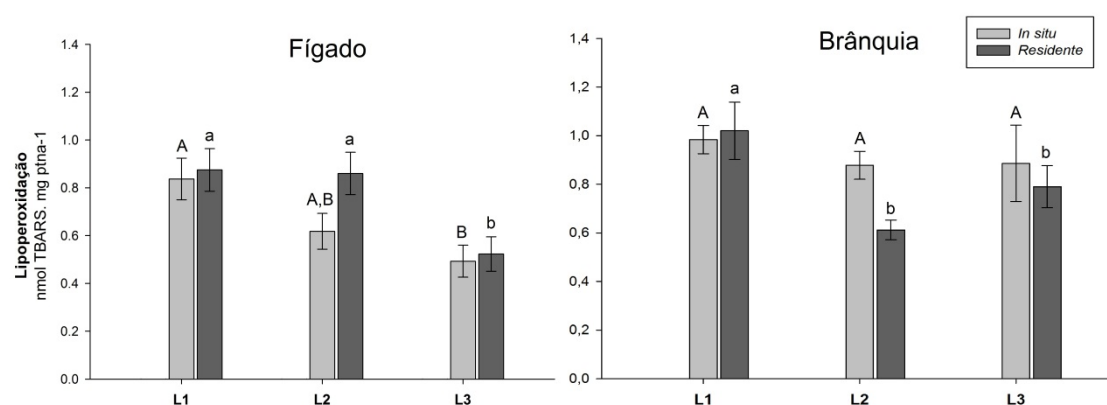


Letras distintas indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$) dentro de cada abordagem experimental.

Liperoxidação

A peroxidação lipídica foi evidenciada (Fig.3.5) pelo aumento de TBARS no fígado dos peixes confinados e residentes na lagoa 1, como também nos peixes coletados na lagoa 2. Os resultados da liperoxidação nas brânquias indicaram um aumento no conteúdo de TBARS apenas nos peixes coletados nas lagoas 1, quando comparada com as demais localidades

Figura 3.5– Liperoxidação em fígado e brânquia de *A. altiparanae* submetidos a testes *in situ* e coletados nas lagoas 1 (L1), 2 (L2) e 3 (L3) ao longo do ribeirão Uberaba.

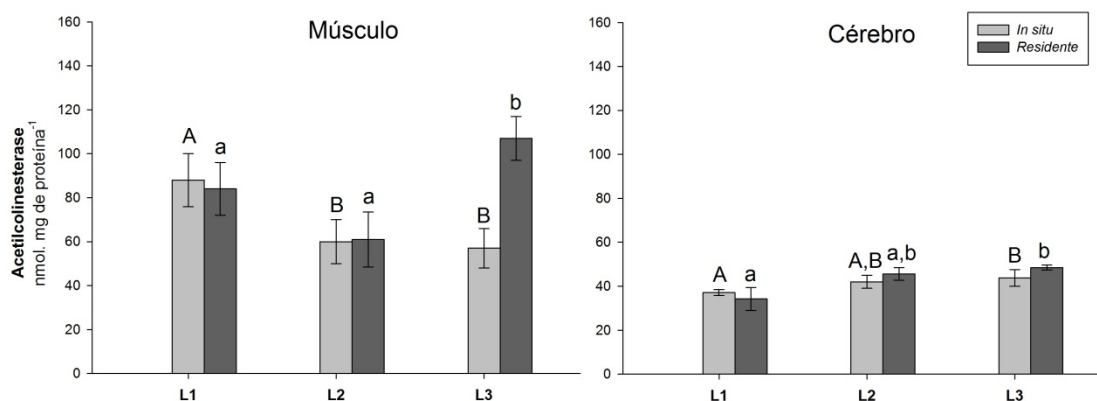


Letras distintas indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$) dentro de cada abordagem experimental.

Acetilcolinesterase

Os resultados da atividade da AChE analisadas no cérebro e músculo dos peixes estão apresentados na Fig. 3.6. No músculo, foi observada uma diminuição significativa da atividade da AChE nos peixes confinados *in situ* nas lagoas 2 e 3. Os animais coletados nas lagoas 1 e 2 apresentaram uma menor atividade enzimática quando comparado com a dos peixes da lagoa 3. Foi observada uma diminuição significativa na atividade da AChE no cérebro dos peixes tanto expostos *in situ* quanto coletados na lagoa 1 com relação as demais lagoas.

Figura 3.6 – Atividade da acetilcolinesterase em músculo e cérebro de *A. altiparanae* submetidos a testes *in situ* e coletados nas lagoas 1 (L1), 2 (L2) e 3 (L3) ao longo do ribeirão Uberaba

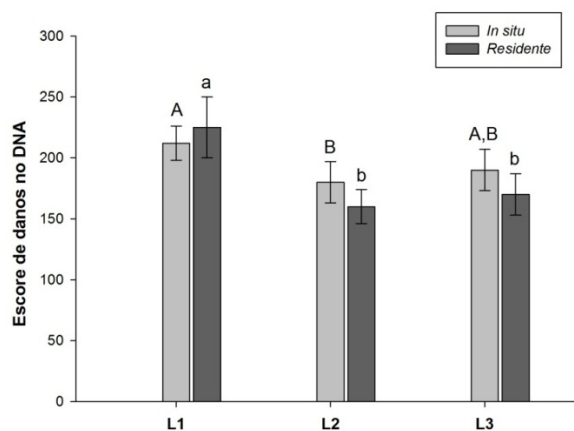


Letras distintas indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$) dentro de cada abordagem experimental

Danos do DNA

Os resultados do teste do cometa estão apresentados na Fig.3.7. Foi observado que tanto os animais confinados quanto os peixes coletados na lagoa 1 apresentaram um aumento na quantidade de danos no material genético comparado com demais locais experimentais.

Figura 3.7 – Escore de danos no DNA em eritrócitos de *A. altiparanae* submetidos a testes *in situ* e coletados nas lagoas 1 (L1), 2 (L2) e 3 (L3) ao longo do ribeirão Uberaba.

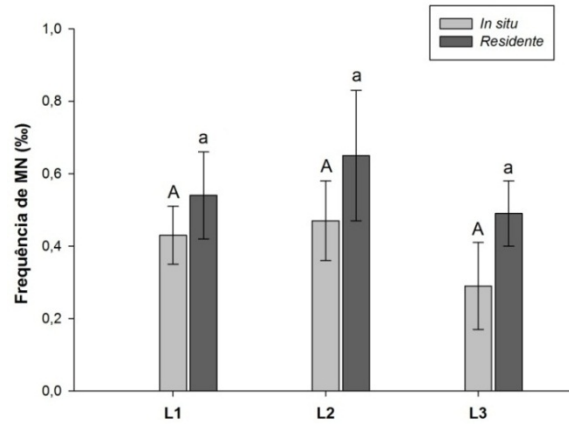


Letras distintas indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$) dentro de cada abordagem experimental.

Micronúcleo (MN), alterações eritrocíticas nucleares (AENS) e eritrócitos imaturos (EI)

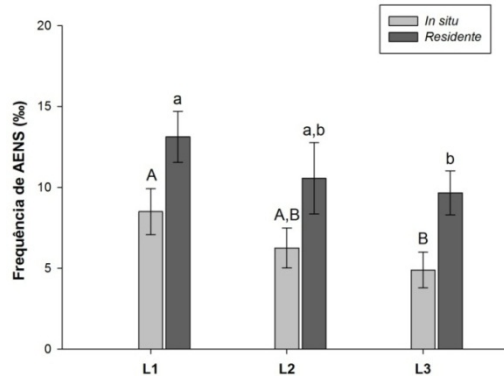
Não foram observadas diferenças significativas nas frequências de MN entre nenhum dos grupos analisados (Fig. 3.8), embora possa se ver uma tendência de aumento nos peixes residentes nas lagoas 1 e 2. Quando analisadas as frequências de alterações morfológicas nucleares (Fig. 3.9), foram observadas maiores frequências destas alterações tanto nos peixes residentes quanto nos peixes coletados na lagoa 1, comparadas com as frequência de AENS nos peixes dos outros locais. Não houve diferença significatina na frequência de eritrócitos imaturos (EI) (Fig.3.10) entre nenhum dos grupos experimentais. As principais alterações encontradas nos eritrócitos de *A. altiparanae* podem ser visualizadas na Fig 3.11 e a proliferação de eritrócitos imaturos nos peixes é demonstrada na Fig.3.12.

Figura 3.8 – Frequência de micronúcleos (MN) em eritrócitos de *A. altiparanae* submetidos a testes *in situ* e coletados nas lagoas 1 (L1), 2 (L2) e 3 (L3) ao longo do ribeirão Uberaba.



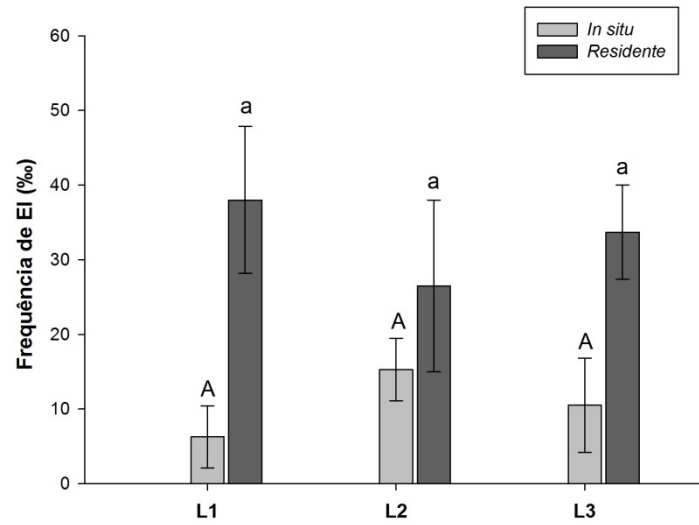
Letras distintas indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$) dentro de cada abordagem experimental.

Figura 3.9 – Frequência de alterações eritrocíticas nucleares (AENS) em *A. altiparanae* submetidos a testes *in situ* e coletados nas lagoas 1 (L1), 2 (L2) e 3 (L3) ao longo do ribeirão Uberaba.



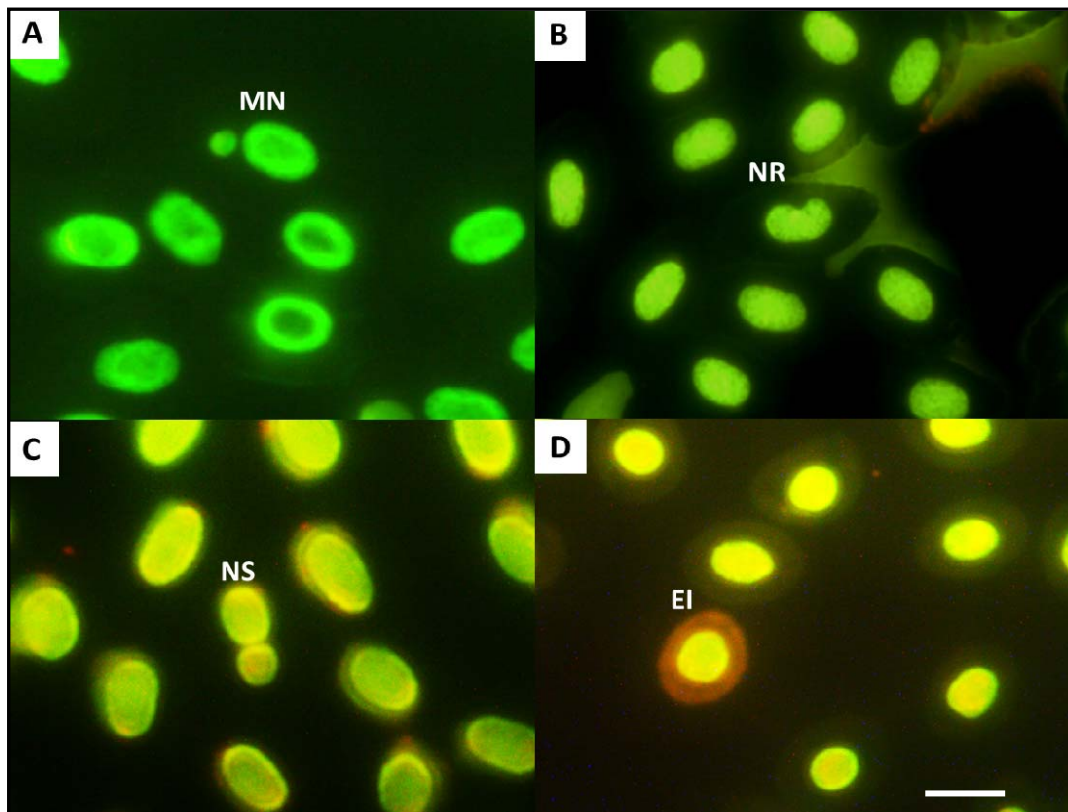
Letras distintas indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$) dentro de cada abordagem experimental

Figura 3.10– Frequência de eritrócitos imaturos (EI) em *A. altiparanae* submetidos a testes *in situ* e coletados nas lagoas 1 (L1), 2 (L2) e 3 (L3) ao longo do ribeirão Uberaba



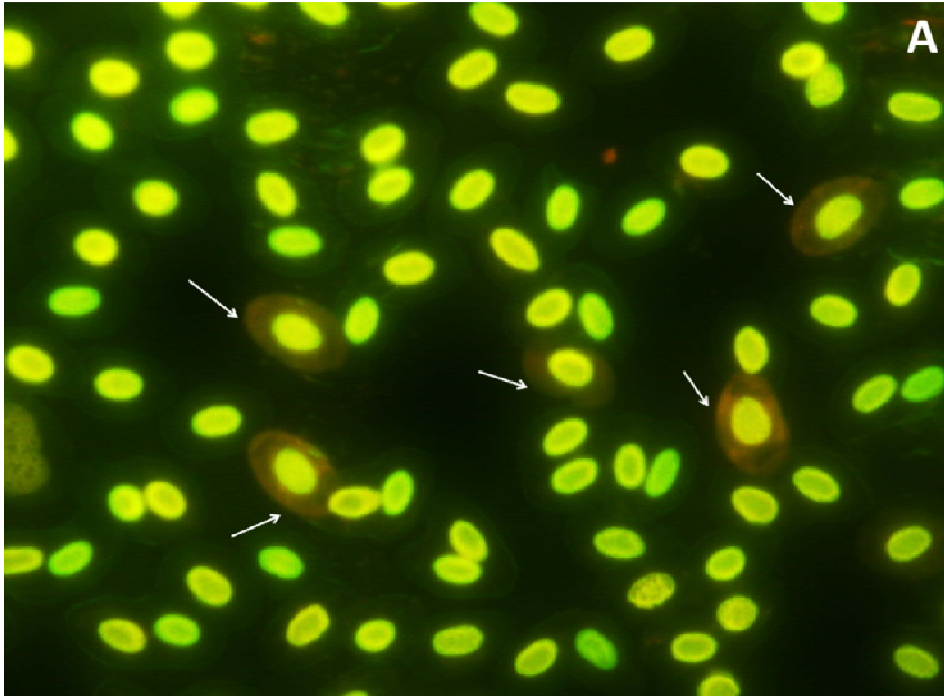
Letras distintas indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$) dentro de cada abordagem experimental

Figura 3.11- Eritrócitos de *A. altiparanae* sob coloração fluorescente de laranja de acridina (LA).



Em A) presença de micronúcleo; B) núcleo com constricção em formato de rim; C) núcleo segmentado e D) eritrócito imaturo (EI). Aumento de 1000X. Barra: 10 μ m.

Figura 3.12- Proliferação de eritrócitos imaturos (setas) em *A. altiparanae* coletados em lagoas de região agrícola.

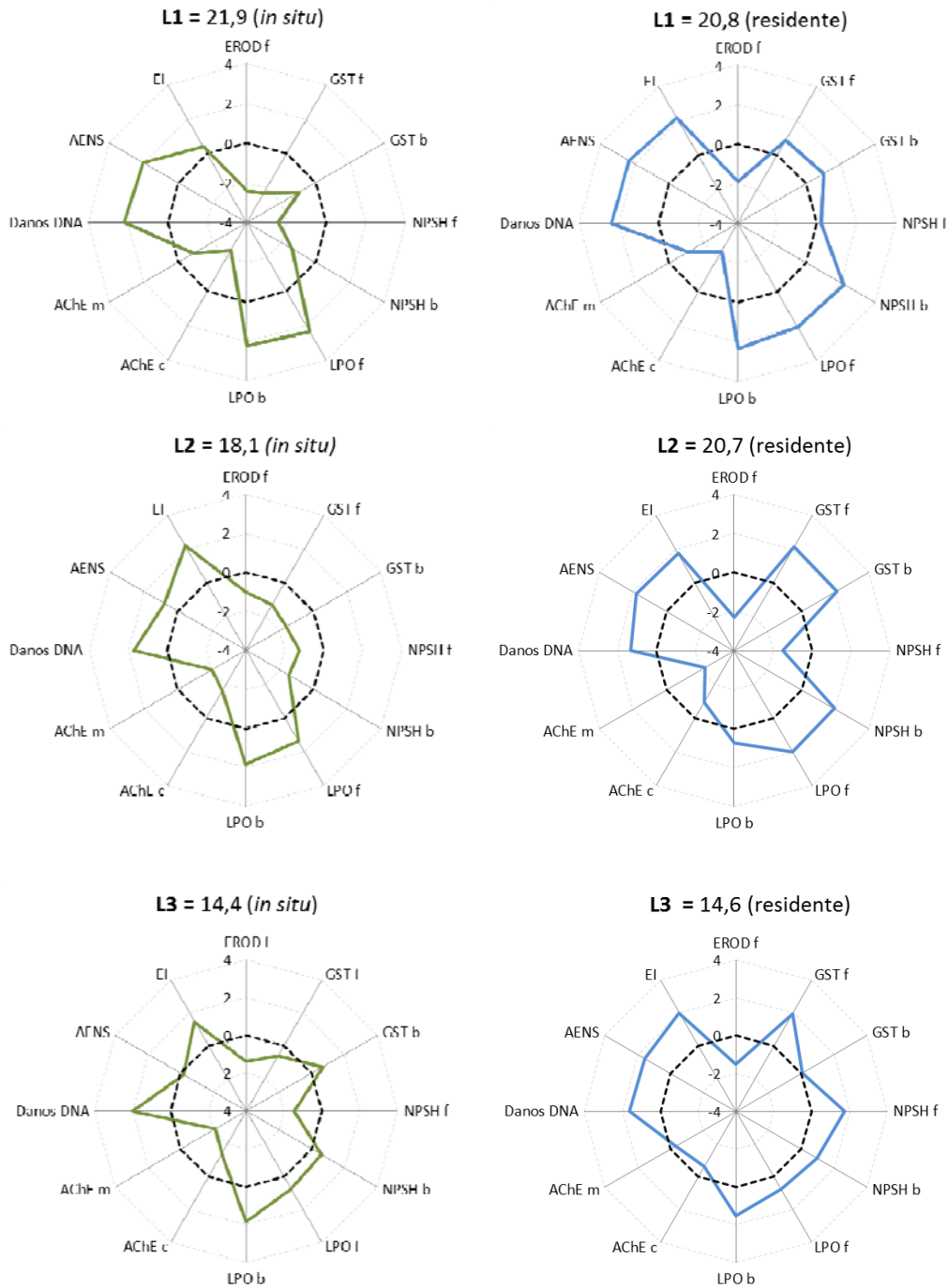


Coloração: laranja de acridina (LA). Aumento: 1000 X.

3.3.4 Comparação entre Peixes “Engaiolados” e Coletados: IBR

Os valores de IBRv2, bem como a representação gráfica do índice estão apresentados na Fig. 3.13. Com relação aos testes *in situ*, observou-se uma possível relação com o gradiente de contaminação ao longo do ribeirão Uberaba. Os valores indicaram que lagoa 1 apresentou o maior valor de IBR (L1= 21,9), seguido pela lagoa 2 (L2= 18,1) e lagoa 3 (L3= 14,4). Os resultados do índice obtidos com os peixes residentes apresentaram valores semelhantes aqueles obtidos com os peixes engaiolados (L1= 20,8, L2= 20,7 e L3= 14,6), porém não demonstraram de forma tão clara a mesma indicação de um gradiente de contaminação.

Figura 3.13 - Índice Integrado de Resposta de Biomarcadores (IBRv2): 7-etoxiresorufina-O-deetilase (EROD), glutationa-S-transferase (GST), tióis não proteicos (NPSH), lipoperoxidação (LPO), acetilcolinesterase (AChE), danos do DNA, alterações eritrócíticas nucleares (AENS) e frequência de eritrócitos imaturos (EI) em diferentes órgãos (f = fígado, b = brânquia, c = cérebro e m = músculo) em *A. altiparanae* submetidos a testes *in situ* e coletados em diferentes lagoas de áreas agrícolas (L1, L2 e L3).



Valores acima de 0 indicam um aumento na resposta do biomarcador e abaixo de 0 indicam diminuição da resposta do biomarcador com relação ao grupo inicial T₀ (linha tracejada).

3.4 DISCUSSÃO

O presente trabalho apresentou uma abordagem pouco investigada na Ecotoxicologia, que consiste na comparação de respostas de organismos residentes e confinados em áreas impactadas, utilizando as respostas de diferentes biomarcadores bioquímicos e genotóxicos para compreender como estes organismos respondem à exposição aguda e crônica a contaminantes ambientais, e como estas respostas refletem o padrão de qualidade do ambiente. Alguns padrões semelhantes de respostas foram observados entre os peixes engaiolados e confinados, como os biomarcadores que refletem efeitos oxidativos, genotóxicos e neurotóxicos. Já os biomarcadores de exposição, como os níveis de tióis não proteicos e atividade de enzimas envolvidas na metabolização de compostos orgânicos apresentaram pouca consistência no padrão de respostas quando comparadas as duas abordagens metodológicas, uma vez que podem ser reflexo de diferentes fatores genéticos e adaptativos dos peixes frente à exposição ao longo prazo.

Alguns parâmetros abióticos, como pH, temperatura e oxigênio dissolvido podem afetar as respostas dos organismos. Os valores normais de O_2 dissolvido na água situam-se em torno de 8 mg.L^{-1} a 25°C (Derisio, 1992). Valores inferiores a este foram encontrados nas águas das lagoas 1 e 2 ($5,5 - 4,8$ e $6,87 - 6,41 \text{ mg.L}^{-1}$ respectivamente). Apesar de concentrações abaixo de 8 mg.L^{-1} , os valores encontrados são considerados aceitáveis, sendo descartada a possibilidade de hipóxia. Variações na temperatura também podem afetar o metabolismo de animais ectotérmicos, podendo ser responsáveis por indução de estresse oxidativo (Lushchak, 2011). Os valores médios de temperatura encontrados variaram de $19,5$ a $22,15^\circ\text{C}$ e estão dentro do esperado para a época do ano. O pH também exerce influência no ecossistema aquático, podendo afetar a fisiologia de diversos organismos. O efeito indireto do pH, especialmente sobre a especiação de metais tóxicos dentro do ambiente aquático também deve ser levado em consideração. Os valores de pH nas três lagoas variaram de $5,4$ a $6,8$ e estão dentro ou próximos dos

valores recomendados pela resolução CONAMA 357/2005, para proteção das comunidades aquáticas.

A exposição de organismos a contaminantes ambientais pode resultar em distúrbios bioquímicos e/ou respostas adaptativas dos organismos (Masfaraud et al., 1992). Na maioria das vezes, os processos metabólicos de biotransformação de fase I e fase II são necessários para desintoxicação e excreção de compostos tóxicos em animais aquáticos (Goksoyr e Föurlin, 1992). Em peixes, a subfamília de enzimas CYP1A, pertencente ao citocromo P450, é responsável pela desintoxicação de uma grande variedade de substâncias tóxicas (Moore et al., 2003). A glutathione-S-transferase atua na segunda fase da biotransformação, conjugando compostos tóxicos ou seus metabólitos com moléculas endógenas, como a glutathione (GSH) para serem eliminados do organismo (Hermes-Lima, 2004). Neste trabalho foi observado uma diminuição da atividade da GST no fígado dos lambaris confinados e residentes na lagoa 1, quando comparadas com os demais locais experimentais. Entretanto, nos peixes residentes, a atividade da GST mostrou-se maior do que a dos outros grupos experimentais, tanto em fígado quanto em brânquias. Desta forma, pode-se deduzir que o aumento da atividade da GST nos peixes residentes é uma resposta adaptativa destes animais frente à exposição crônica à mistura de agrotóxicos presentes nestes ambientes. Vale ressaltar que ao serem considerados os efeitos do estresse em organismos cronicamente expostos a produtos químicos em seu ambiente natural (exposição a longo prazo por diversas gerações), nenhuma resposta simples ou geral pode ser descrita (Biagiante-Risbourg et al., 2013).

Diversos autores já relataram aumento na atividade da GST em diferentes espécies de peixes expostos a agrotóxicos, alguns dos quais são utilizados na região do presente estudo. Por exemplo, Dong e colaboradores (2013) relataram aumento da atividade GST em larvas de *Danio rerio* expostos ao organoclorado endossulfan. Oruc et al. (2004) observaram aumento da atividade desta enzima em duas espécies de peixes expostos ao 2,4 D. Paulino et al. (2012) observaram aumento na atividade da GST nas brânquias do peixe neotropical *P. lineatus* após exposição sub-crônica à atrazina. Na região de Londrina, PR, a atrazina é um dos herbicidas mais utilizados nas monoculturas de milho e foi detectada, embora em baixas concentrações, em amostras de água e sedimentos das lagoas.

A glutathiona reduzida (GSH) é um tripeptídeo que tem papel fundamental em reações de oxidação/redução, transporte de aminoácidos e detoxificação de muitos agentes tóxicos, constituindo a primeira linha de defesa contra lesões celulares mediadas por oxidantes (Van der Oost et al., 2003). No fígado dos lambaris expostos *in situ* na lagoa 1, a diminuição do conteúdo de GSH pode estar indicando um esgotamento das reservas do antioxidante mediante uma grande produção de ERO, ou mesmo interferências na síntese ou reciclagem da GSH pela GR (glutathiona-reduzida). Compostos geradores de oxiradicais como os agrotóxicos, podem alterar o metabolismo de GSH de várias formas (Otto e Moon, 1995). A diminuição do conteúdo hepático de NPSH nos peixes transplantados também pode ter interferido diretamente na atividade da GST nos mesmos animais, já que a GST utiliza a GSH (um dos NPSH presentes em abundância nas células) na conjugação com xenobióticos.

Fatores como a idade peixes, fase de desenvolvimento, condição nutricional, sexo e fase do ciclo reprodutivo, também pode ter efeitos profundos sobre alguns parâmetros (Whyte et al., 2000; Van der Oost et al., 2003). A diferença de tamanho entre peixes selvagens e engaiolados no presente estudo pode oferecer uma explicação para a diferença dos níveis observados, como a GST e o conteúdo de NPSH. Os níveis hepáticos de tióis não proteicos nos peixes engaiolados exibiu uma evidência de esgotamento nos locais mais poluídos, como geralmente pode ser esperado sob condições de estresse oxidativo (Lenton et al., 1999). Já nos peixes residentes, os níveis de NPSH mantiveram-se semelhantes entre os locais com diferentes níveis de contaminação. Contudo, houve geralmente uma menor concentração de NPSH nos peixes mantidos em gaiolas em comparação com seus homólogos nativos, sugerindo que os peixes engaiolados ou eram mais sujeitos à exposição específica ao contaminante e/ou os peixes selvagens são mais resistentes aos efeitos de tal contaminação. Alternativamente, esta diferença pode ser devido ao um processo de retorno, conduzindo a uma elevação a longo prazo dos níveis GSH através do aumento da síntese nos peixes selvagens, após um esgotamento das reservas em prazo mais curto em decorrência do estresse oxidativo, como observado nos peixes engaiolados.

Populações nativas de peixes podem sofrer adaptação genética, o que envolvendo transferência de informação para a prole. No pior dos casos,

substâncias químicas podem ter efeitos severos (evasão/fuga, morte) levando a uma queda das densidades populacionais. Se os organismos sobreviverem à exposição a estes produtos químicos podem exercer uma pressão seletiva que conduz à presença de genótipos resistentes em áreas impactadas (Biagianti-Risbourg et al., 2013). Desta forma, a compreensão das respostas destes biomarcadores de exposição em peixes residentes, quando comparados com organismos transplantados, permanece um pouco obscura. Assim, novas investigações devem ser realizadas, como por exemplo, análises moleculares de genes relacionados aos processos de detoxificação, que poderiam indicar se os peixes residentes em áreas agrícolas estão geneticamente adaptados às condições estressoras do ambiente em que se encontram.

O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a capacidade antioxidante total da célula. A capacidade antioxidante se dá por ação conjunta de enzimas, como a catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase e moléculas de pequeno peso molecular como a glutathione reduzida, α -tocoferol e o β -caroteno (Hermes-Lima 2004). No presente trabalho, a ocorrência de lipoperoxidação (LPO) foi evidenciada tanto nos peixes expostos a algumas lagoas, quanto nos animais nativos destes ambientes. No fígado, a ocorrência de LPO pode ter sido intensificada pela diminuição de tióis não proteicos, como a GSH, o antioxidante primário das células. Nas brânquias dos lambaris também ocorreu LPO, apesar dos níveis de NPSH no órgão não terem sido alterados.

A ocorrência de LPO e danos no DNA no fígado e brânquias de *A. altiparanae* residentes das áreas agrícolas avaliadas podem estar indicando que uma fase de exaustão. Indivíduos expostos cronicamente a substâncias químicas (como poluentes orgânicos, por exemplo), podem apresentar um aumento significativo nas respostas de biomarcadores bioquímicos (como o metabolismo de biotransformação, estresse oxidativo). Entretanto, quando o estresse químico agudo ou crônico ultrapassa os limites de compensação, as respostas de biomarcadores são muitas vezes esgotadas e podem até diminuir abaixo dos valores controle (Biagianti-Risbourg 1993). Durante a exaustão, ocorre o esgotamento de reservas energéticas e ocorrem eventos degenerativos, como por exemplo, a peroxidação lipídica, danos ao DNA, necrose e lise celular.

Biomarcadores bioquímicos têm a vantagem de um tempo de resposta rápido. No entanto, a incerteza se a resposta do biomarcador reflete um estado de adaptação às condições de estresse ou um estado de exaustão representa uma limitação em termos de relevância biológica e toxicológica da resposta do biomarcador (Paris-Palacios, 1999). Uma análise multidisciplinar adicional, utilizando um painel variado de biomarcadores (incluindo alterações anátomo-morfológicas, histopatológicas e imunológicas) é indispensável para caracterizar o estado funcional dos órgãos e, assim, o provável estado de saúde dos indivíduos (Klaunig et al., 1979; Paris-Palacios et al., 2000).

Com relação à atividade da AChE, foi observada uma inibição da atividade desta enzima tanto no cérebro como no músculo dos peixes confinados e nos peixes coletados em alguns dos locais experimentais. Esta enzima, presente nas sinapses colinérgicas e placas motoras terminais, é responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina em colina e ácido acético. A inibição da AChE está classicamente associada com o mecanismo de ação tóxica de inseticidas organofosforados e carbamatos (Payne et al., 1996) e distúrbios na sua atividade podem afetar a locomoção e equilíbrio em peixes, prejudicando a alimentação, escape e comportamento reprodutivo (Bretaud et al. 2000; Pessoa et al. 2011). A atividade da AChE em peixes também pode ser modificada por agrotóxicos de outras classes, tais como organoclorados, como o endosulfan (Dutta e Arends, 2003). Outros autores também já demonstraram o efeito anticolinesterásico do glifosato em diferentes espécies de peixes (Gluszczak et al., 2006; Gluszczak et al., 2007; Cattaneo et al., 2011) e também dos produtos formulados a base de glifosato, o Roundup® e o Roundup Transorb®, em *Prochilodus lineatus* (Modesto e Martinez, 2010a; Modesto e Martinez, 2010b). Dependendo da natureza química do xenobiótico, a inibição da AChE pode ser irreversível. Apesar do glifosato não ter sido detectado nas amostras de água e sedimentos das lagoas, a inibição da AChE pode refletir efeitos de exposições anteriores ao herbicida.

Com relação aos biomarcadores genotóxicos, foi observado um aumento na quantidade de quebras no DNA (escore de danos), detectadas pelo teste do cometa tanto nos peixes confinados quanto coletados na lagoa 1, que apresenta as maiores concentrações dos contaminantes avaliados. Estes resultados corroboram os dados encontrados na literatura para peixes expostos a diferentes agrotóxicos utilizados

em grande escala na região de estudo, como a atrazina (Ventura et al., 2008; Çavas, 2011; Nwani et al., 2011; Santos e Martinez, 2012) e herbicidas à base de glifosato, tanto em exposições de laboratório como em trabalhos de campo em áreas potencialmente contaminadas com o herbicida (Çavas e Konen, 2007; Cavalcante et al., 2008; Rossi et al., 2011; Ramsdorf et al., 2012)

Neste trabalho não foram observadas diferenças significativas na frequência de micronúcleos em nenhum dos grupos experimentais, embora possa ser observada uma tendência de aumento na frequência de MN nos peixes residentes, quando comparados ao grupo controle. A frequência de MN em eritrócitos periféricos de peixes é geralmente baixa e pode ocorrer espontaneamente a taxas que variam de acordo com a manipulação dos peixes e técnica empregada (Al-Sabti e Metcalfe, 1995). Apesar da ampla utilização de eritrócitos na avaliação de genotoxicidade, alguns autores consideram ser menos sensível do que outros tecidos, como brânquias (Hayashi et al., 1998; Çavas e Ergene-Gozukara, 2005).

Apesar da ocorrência de MN não ter sido significativa, alterações eritrocíticas nucleares (AENS), como núcleo em forma de rim, núcleos lobulados e segmentados, além de células binucleadas, foram observadas em maior frequência nos peixes coletados na lagoa, quando comparados com as demais. Vários autores tem demonstrado uma relação positiva entre a frequência de AENS e micronúcleos, sugerindo assim que a identificação dessas alterações pode ser útil como uma análise complementar em estudos de genotoxicidade em peixes (Ferraro et al., 2004; Ergene et al., 2007). Sendo assim, a não significância estatística para as frequências de micronúcleos não refletem ausência de mutagenicidade dos compostos presentes nos locais experimentais.

A avaliação da frequência de eritrócitos imaturos (EI) não demonstrou diferença significativa em nenhum dos grupos analisados. De acordo com Udroi, 2006, alterações na dinâmica hematopoiética podem gerar conflitos de resultados, pois diversos agentes genotóxicos podem promover uma redução da eritropoiese, por outro lado em animais manipulados em laboratório vários fatores podem contribuir com a indução de eritrócitos imaturos, levando a ocorrência de falsos-positivos. A análise da frequência de EI em peixes é importante para a compreensão da dinâmica eritropoiética, porém a sua análise isolada não permite uma identificação precisa das causas desse aumento.

A abordagem utilizando organismos engaiolados ofereceu algumas vantagens, como a padronização dos peixes com relação ao tamanho e idade, menor estresse durante a manipulação, facilidade de obtenção de indivíduos em número satisfatório e reflexão mais confiável do nível de contaminação de cada local. Os valores de IBR obtidos com estes peixes indicaram um gradiente de contaminação ao longo do ribeirão, fato este que pode ser confirmado com as análises químicas da água e sedimento. O gradiente observado no sentido nascente – foz ($L1 > L2 > L3$) indicada o maior aporte de contaminantes na nascente do ribeirão, que encontra-se totalmente cercada por cultivos agrícolas que chegam à poucos metros do corpo d'água, facilitando o escoamento superficial ou mesmo a contaminação das águas subterrâneas que formam esta nascente. Por tratar-se de lagoas, portanto ambientes lênticos, os agrotóxicos tendem a ser acumular mais nestes locais, diminuindo seu transporte com o fluxo da água. Quando observados os valores de IBR nos peixes residentes, observa-se algumas semelhanças com os peixes engaiolados, embora tenha sido verificado uma menor capacidade de discriminação do gradiente de contaminação ao longo do ribeirão. Estas diferenças podem, pelo menos em parte, estar relacionadas com fatores adaptativos e a mobilidade destes animais dentro do seu ambiente. Apesar disto, esta abordagem utilizando peixes nativos pode também ser considerada satisfatória neste estudo, uma vez que houve uma correspondência das respostas de biomarcadores integradas no IBR com o local mais e menos contaminado.

Nossos resultados demonstraram que os biomarcadores altamente sensíveis (tais como Ensaio Cometa e lipoperoxidação) dão resultados semelhantes em peixes transplantados e residentes, e os que refletem o produto de eventos cumulativos (como o teste de micronúcleos [embora não tenha sido significativo] e alterações eritrocíticas nucleares) têm uma melhor capacidade discriminativa quando aplicado a exemplares cronicamente expostos (nativos). Estes resultados ressaltam a importância da seleção dos biomarcadores e sugerem análises paralelas de peixes “engaiolados” e residentes para uma melhor caracterização da poluição nestas áreas de estudo. Para fins de diagnóstico e monitoramento da qualidade da água nestas áreas agrícolas, a utilização de biomarcadores de efeito, como LPO, danos no DNA e AChE é mais indicada, uma vez que as respostas

puderam ser detectadas tanto em exposições agudas (testes *in situ*) quanto crônicas (coleta de animais residentes).

3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akaishi, F.M., Silva de Assis, H.C., Jakobi, S.C.G., Eiras-Stofella, D.R., St-Jean, S.D., Courtenay, S.C., Lima, E.F., Wagener, A.L.R., Scofield, A.L., Ribeiro, C.A.O. 2004. Environmental contamination and morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax sp.*) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 46, 244-253.
- Al-Sabti, K., Metcalfe, C.D. 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research—Genetic Toxicology*, 343, 121-135.
- Alves Costa, J.R.M., Mela, M., Silva de Assis, H.C., Pelletier, E., Randi, M.A.F., Oliveira Ribeiro, C.A. 2007. Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67, 82-88.
- ANVISA & UFPR. Seminário de mercado de agrotóxico e regulação. ANVISA, Brasília, 11 abril de 2012.
- Barbee, G.C., Barich, J., Duncan, B., Bickham, J.W., Matson, C.W., Hintze, C.J., Autenrieth, R.L., Zhou, G.D., McDonald, T.J., Cizmas, L., Norton, D., Donnelly, K.C. 2008. In situ biomonitoring of PAH-contaminated sediments using juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Ecotoxicology Environmental Safety*, 71, 454-464.
- Beutler, E., Durom, O., Kelly, B.M. 1963. Improved method for the determination of blood glutathione. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 61, 882-890.
- Biagiante-Risbourg, S.; Paris-Palacios, S.; Mouneyrac, C.; Amiard-Triquet, C. 2013. Pollution Acclimation, Adaptation, Resistance, and Tolerance in Ecotoxicology. In: Férard, J., Claise, C. (ed). *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*. Springer, Berlin, pp 883-892.

- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Bretaud, S., Toutant, J.P., Saglio, P. 2000. Effects of carbofuran, diuron and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicology Environmental Safety*, 47, 117–124.
- Camejo, G., Wallin, B., Enojärvi, M. 1998. Analyses of Oxidation and Antioxidants using Microtiter Plates. In: Armstrong, D. (ed) Free radical and antioxidants protocols. Humana Press, New Jersey, pp.377-387.
- Carrasco, K.R., Tilbury, K.L., Myers, M.S. 1990. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 47, 2123 -2136.
- Cattaneo, R., Clasen, B., Loro, V.L, Menezes, C.C., Pretto, A., Baldisserotto, B., Santi, A., Avila, L.A. 2011. Toxicological Responses of *Cyprinus carpio* Exposed to a Commercial Formulation Containing Glyphosate. *Bulletin Environmental Contamination Toxicology*, 87, 597-602.
- Cavalcante, D.G.S.M., Martinez, C.B.R., Sofia, S.H. 2008. Genotoxic effects of roundup on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutation Research*, 655, 41–46.
- Çavas, T. 2011. In vivo genotoxicity evaluation of atrazine and atrazine-based herbicide on fish *Carassius auratus* using the micronucleus test and the comet assay. *Food Chemical Toxicology*, 49, 1431-1435.
- Çavas, T., Ergene-Gözükara, S. 2005. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquatic Toxicology*, 74, 264-271
- Çavas, T., Könen, S. 2007. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagenesis* 22, 263–268.
- Cerejeira, M.J., Viana, P., Batista, S., Pereira, T., Silva, E., Valerio, M.J., Silva, A., Ferreira, M., Silva-Fernandes, A.M. 2003. Pesticides in Portuguese surface and ground waters. *Water Research*, 37, 1055-1063.
- Couillard, C.M., Lebeuf, M., Ikonomou, M.G., Poirier, G.G., Cretney, W.J. 2005. Low hepatic ethoxyresorufin-o-deethylase activity correlates with high organochlorine

- concentrations in Atlantic tomcod from the Canadian east coast. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24, 2459–2469.
- Derisio, J.C. 1992. *Introdução ao controle de poluição ambiental*. São Paulo: Cetesb.
- Dong, M., Zhu, L., Shao, B., Zhu, S., Wang, J., Xie, H., Wang, J., Wang, F. 2013. The effects of endosulfan on cytochrome P450 enzymes and glutathione S-transferases in zebrafish (*Danio rerio*) livers. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 92, 1-9.
- Dutta, H.M., Arends, D.A. 2003. Effects of endosulfan on brain acetylcholinesterase activity in juvenile bluegill sunfish. *Environmental Research*, 91, 157–162.
- Eggens, M.L., Galgani, F. 1992. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in flatfish-fast determination with a fluorescence plate-reader. *Marine Environmental Research*, 33, 213-221.
- Ellman, G.L.; Courtney, K.D.; Andres J.R.V.; Featherstone, R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88-95.
- Ergene, S., Çavas, T., Celik, A., Koleli, N., Kaya, F., Karahan, A. 2007. Monitoring of nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of three fish species from the Goksu Delta (Turkey): genotoxic damage in relation to water pollution. *Ecotoxicology*, 16, 385–391.
- Fabrizi, L., Gemma, S., Testai, E., Vittozzi, L. 1999. Identification of the cytochrome P450 isoenzymes involved in the metabolism of diazinon in the rat liver. *Journal of Biochemistry and Molecular Toxicology*, 13, 53–61.
- Ferraro, M.V.M., Fenocchio, A.S., Mantovani, M.S., Oliveira Ribeiro, C.A., Cestari, M.M. 2004. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. *Genetics and Molecular Biology*, 27, 103-107.
- Garutti, V., Britski, H.A. 2000. Descrição de uma nova espécie de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) na bacia do alto do rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero da bacia. *Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia, Série Zoologia*, 13, 65-88.
- Gluszczak, L., Miron, D.S., Crestani, M., Fonseca, M.B, Pedron, F.A., Duarte, M.F., Vieira, V.L. 2006. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity

- and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Ecotoxicology Environmental Safety*, 65, 237–241.
- Gluszczak, L., Miron, D.S., Moraes, B.S., Simões, R.R., Schetinger, M.R.C., Morsch, V.M., Loro, V.L. 2007. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Comparative Biochemistry Physiology C*, 146, 519–524.
- Goksoyr, A., Forlin, L. 1992. The cytochrome P450 system in fish. *Aquatic toxicology and environmental monitoring. Aquatic Toxicology*, 22, 287-312.
- Hayashi, M., Ueda, T., Uyeno, K. 1998. Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 399, 125-133.
- Heath, A.G. 1995. *Water Pollution and Fish Physiology*, 2nd ed. Lewis Publishers, Boca Raton.
- Hermes-Lima, M. 2004. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: Storey, K.B. (ed.) *Functional metabolism: regulation and adaptation*. John Wiley & Sons, New York, p. 319-368.
- IBAMA-Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: uma abordagem ambiental. 2010. Disponível em:<http://www.ibama.gov.br/qualidade-ambiental/relatorios-de-agrotoxicos/>. Acesso em: 05 jul. 2011.
- Keen, J.H., Habig, W.H., Jakobi, W.B. 1976. Mechanism for the several activities of the glutathione-S-transferases. *Journal of Biological Chemistry*, 251, 6183-6188.
- Klaunig, J.E., Lipsky, M.M., Trump, B.F. 1979. Biochemical and ultra structural changes in teleost liver following sub acute exposure to PCB. *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*, 2,953–963.
- Klobucar, G.I.V., Stambuk, A., Pavlica, M., Peric, M.S., Hackenberger, B.K., Hylland, K. 2010. Genotoxicity monitoring of fresh water environments using caged carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology*, 19, 77–84.
- Kobayashi, H., Suguyama, C., Morikawa, Y., Hayashi, M., Sofuni, T. 1995. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis. *MMS Commun*, 3, 103–115.

- Kolankaya, D. 2006. Organochlorine pesticide residues and their toxic effects on the environment and organisms in Turkey. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 86, 147-160.
- Lemos, C.T., Iranço, F.A., Oliveira, N.C.D., Souza, G.D., Fachel, J.M.G. 2008. Biomonitoring of genotoxicity using micronuclei assay in native population of *Astyanax jacuhiensis* (Characiformes: Characidae) at sites under petrochemical influence. *Science of the Total Environment*, 406, 337-343.
- Lenton, K.J., Therriault, H., Fulop, T., Payette, H., Wagner, J.R., 1999. Glutathione and ascorbate are negatively correlated with oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Carcinogenesis*, 20, 607-613.
- Lushchak, V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, 101, 13-30.
- Masfraid, J.F., Devaux, A., Pfohl-Leszkowic, A., Malaveille, A., Monod, G., 1992. DNA adduct formation and ethylresorufi-O-deethylase induction in primary culture of rainbow trout hepatocytes exposed to benzo[a]pyrene. *Toxicology in Vitro* 6 (6), 523-531.
- Modesto, K.A., Martinez, C.B.R. 2010a. Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere*, 81, 781-787.
- Modesto, K.A., Martinez, C.B.R. 2010b. Roundup causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere*, 78, 294-299.
- Moore, M.J., Mitrofanov, I.V., Valentini, S.S., Volkov, V.V., Kurbskiy, A.V., Zhimbey, E.N., Eglinton, L.B., Stegeman, J.J. 2003. Cytochrome P4501A expression, chemical contaminants and histopathology in roach, goby and sturgeon and chemical contaminants in sediments from the Caspian Sea, lake Balkhash and Ily river delta. *Marine Pollution Bulletin*, 46, 107-119.
- Niencheski, L.F., Fillmann, G. 2006. Contaminantes: Metais, Hidrocarbonetos e Organoclorados. In.: Lana, P.C., Bianchini, A., Ribeiro, C.A.O., Niencheski, L.F.H., Fillmann, G., Santos, C.S.G. (ed.). *Avaliação Ambiental de Estuários Brasileiros: Diretrizes Metodológicas*. Museu Nacional, Rio de Janeiro, pp. 63-118.
- Nwani, C.D., Nagpure, N.S., Kumar, R., Kushwaha, B., Kumar, P., Lakra, W.S. 2011. Mutagenic and genotoxic assessment of atrazine-based herbicide to freshwater

- fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus test and single cell gel electrophoresis. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 31, 314-322.
- Orsi, M.L., Shibatta, O.A., Silva-Souza, A.T. 2002. Caracterização biológica de populações de peixes do rio Tibagi, localidade de Sertanópolis. In: Medri, M. E., Bianchini, E., Shibatta, O.A., Pimenta, J.A. A bacia do rio Tibagi. Londrina, MC Gráfica.
- Oruc, E.O., Sevgiler, Y., Uner, N. 2004. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 137, 43-51.
- Otto, D.M.E., Moon, T.W. 1995. 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl effects on antioxidant enzymes and glutathione status in different tissues of rainbow trout. *Pharmacology and Toxicology*, 77, 281-287.
- Paris-Palacios, S. 1999. Toxicologie-Ecotoxicologie des pesticides et des mé taux lourds presents dans le vignoble champenois. Etude de leur impact hepatique chez les Cyprinidés. Thèse del'Université de Reims Champagne-Ardenne.
- Paris-Palacios, S., Biagianti-Risbourg, S., Vernet, G. 2000. Biochemical and (ultra) structural hepatic perturbations of *Brachydanio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) exposed to two sublethal concentrations of copper sulfate. *Aquatic Toxicology*, 50,109–124.
- Paulino, M. G., Souza, N.E.S., Fernandes, M.N. 2012. Subchronic exposure to atrazine induces biochemical and histopathological changes in the gills of a Neotropical freshwater fish, *Prochilodus lineatus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 80, 6-13.
- Payne, J.F., Mathieu, A., Melvin, W., Fancey, L.L. 1996. Acetylcholinesterase, an Old Biomarker with a New Future? Field Trials in Association with Two Urban Rivers and a Paper Mill in Newfoundland. *Marine Pollution Bulletin*, 32, 225-231.
- Pessoa, P.C., Luchmann, K.H., Ribeiro, A.B., Veras, M.M., Correa, J.R.M.B., Nogueira, A.J., Bairy, A.C.D., Carvalho, P.S.M. 2011. Cholinesterase inhibition and behavioral toxicity of carbofuran on *Oreochromis niloticus* early life stages. *Aquatic Toxicology*, 105, 312-320.
- Ramsdorf, W.A., Ferraro, M.V.M., Oliveira-Ribeiro,C.A., Costa, J.R.M., Cestari, M.M. 2009a.Genotoxic evaluation of different doses of inorganic lead (PbII) in *Hoplias malabaricus*. *Environmental and Monitoring Assessment*, 158, 77-85.

- Ramsdorf, W.A., Guimarães, F.S.F., Ferraro, M.V.M., Gabardo, J., Trindade, E.S., Cestari, M.M. 2009b. Establishment of experimental conditions for preserving samples of fish blood for analysis with both comet assay and flow cytometry. *Mutation Research*, 673, 78-81.
- Ramsdorf, W.A., Vicari, T.A., Almeida, M.I.M., Artoni, B.F., Cestari, M.M. 2012. Handling of *Astyanax sp.* for biomonitoring in Cangüiri Farm within a fountainhead (Iraí River Environment Preservation Area) through the use of genetic biomarkers. *Environmental Monitoring and Assessment*, 184, 5841-5849.
- Regoli, F., Principato, G. 1995. Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussels *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers. *Aquatic Toxicology*, 31, 143–164
- Rodrigues, A.C.F. 2009. Estudo de variações bioquímicas e morfológicas induzidas por pesticidas organofosforado e carbamato em tilápia (*Oreochromis niloticus*) e cascudo (*Pterygoplichthys anisitsi*), como biomarcadores de contaminação ambiental. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto.
- Rossi, S.C., Silva, M.D., Piancini, L.D., Ribeiro, C.A.O., Cestari, M.M., Assis, H.C.S. 2011. Sublethal Effects of Waterborne Herbicides in Tropical Freshwater Fish. *Bulletin Environmental Contamination Toxicology*, 87, 603-607.
- Sanchez, W., Burgeot, T., Porcher, J. 2013. A novel “Integrated Biomarker Response” calculation based on reference deviation concept. *Environmental Science Pollution Research*, 20, 2721-2725.
- Santos, T.G., Martinez, C.B.R. 2012. Atrazine promotes biochemical changes and DNA damage in a Neotropical fish species. *Chemosphere*, 89, 1118-1125.
- Schlenk, D., Handy, R., Steinert S., Depledge, M., Benson, W. 2008. Biomarkers. In: Di Giulio, R.T., Hinton D.E. (ed). *The Toxicology of Fishes*. CRC Press, New York, pp. 683-715.
- Schultz, U.H., Martins-Junior, H. 2000. *Astyanax fasciatus* as bioindicator of water pollution of Rio dos Sinos, RS, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 61, 615–622.

- Shibatta, O.A., Orsi, M.L., Bennemann, S. T., Silva-Souza, A. T. 2002. Diversidade e distribuição de peixes na bacia do rio Tibagi. In: Medri, M.E., Bianchini, E., Shibatta, O.A., Pimenta, J.A. A bacia do rio Tibagi. M.E, Londrina.
- Silva, A.G., Martinez, C.B.R. 2007. Morphological changes in the kidney of a fish living in an urban stream. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 23, 185-192.
- SINDAG (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola), 2009.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L.A.1988. Single technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cellular Research*, 175, 184–191.
- Spalding, R.F., Exner, M.E., Snow, D.D., Cassada, D.A., Burbach, M.E., Monson, S.J. 2003. Herbicides in ground water beneath Nebraska's management systems evaluation area. *Journal of Environmental Quality*, 32, 92-98.
- Stegeman, J. J., Hahn, M. E. 1994. Biochemistry and molecular biology of monooxygenase: current perspective on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. In: Malins, D. C.; Ostrander, G. K. (ed). *Aquatic toxicology; Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives*. Lewis Publishers, CRC press, Boca Raton.
- Udroi, I. 2006. The micronucleus test in piscine erythrocytes. *Aquatic Toxicology*, 79, 201–204.
- Ueda, T., Hayashi, M., Koide, N., Sofuni, T., Kobayashi, J.1992. A preliminary study of the micronucleus teste by acridine orange fluorescent staining compared with cromossomal aberration teste using fish erythropoietic and embrionic cells. *Water Science and Technology*, 25, 235-240.
- Van Der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13, 57–149.
- Ventura, B.C., Angelis, D.F., Marin-Morales, M.A. 2008. Mutagenic and genotoxic effects of the atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by micronuclei test and the comet assay. *Pesticides Biochemical and Physiology*, 90, 42–51.
- Wheelock, C.E., Eder, K.J., Werner, I., Huang, H., Jones, P.D., Brammell, B.F., Elskus, A.A., Hammock, B.D. 2005. Individual variability in esterase activity and

CYP1A levels in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) exposed to esfenvalerate and chlorpyrifos. *Aquatic Toxicology*, 74, 172-192.

Wilhelm-Filho, D., Torres, M.A., Tribess, T.B., Pedrosa, R.C., Soares, C.H.L. 2001. Influence of season and pollution on the antioxidant defenses of the cichlid fish acar (*Geophagus brasiliensis*). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 34, 719-726.

Winkaler, E.U., Silva, A.G., Galindo, H.C., Martinez, C.B.R. 2001. Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná. *Acta Scientiarum*, 23: 507–514.

CAPÍTULO IV

CONCLUSÕES GERAIS

- Os ribeirões avaliados neste trabalho, de forma geral, apresentam um comprometimento da qualidade de suas águas em consequência da contaminação de origem agrícola;
- As espécies *P. lineatus* e *A. altiparanae* mostraram-se sensíveis aos efeitos da exposição à agrotóxicos em condições de campo;
- Diferenças sazonais, principalmente a temperatura e a entrada/diluição de contaminantes em decorrência de variações pluviométricas sazonais podem ter efeitos nas respostas dos organismos aquáticos frente à contaminação;
- Os potenciais biomarcadores mais adequados para o monitoramento de áreas agrícolas são os biomarcadores de efeito: danos oxidativos (LPO), danos no DNA (teste do cometa) e AChE;
- Peixes em ambientes agrícolas podem ter a sua saúde comprometida, visto a ocorrência de danos oxidativos, genéticos e neurotóxicos que podem comprometer funções biológicas importantes para a sobrevivência dos animais, como o comportamento crescimento e reprodução.
- Para fins de monitoramento e diagnóstico da qualidade da água em regiões rurais, os testes *in situ* mostraram-se bastante sensíveis e adequados; permitindo uma melhor discriminação dos níveis de contaminação dos locais investigados;
- As análises integradas das respostas de biomarcadores, propostas pelo IBR mostraram uma boa relação com os níveis de contaminantes presentes nos ribeirões investigados.

CAPÍTULO V

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O capítulo 3 teve como objetivo avaliar a qualidade de três ribeirões, pertencentes à bacia do rio Tibagi, no município de Londrina, PR e verificar a influência de fatores sazonais, como a pluviosidade e temperatura, sobre as respostas biológicas dos organismos. Os resultados mostraram que os ribeirões Apertados e Jacutinga são os mais afetados pelas atividades agrícolas, fato este confirmado pelos maiores valores do Índice Integrado de resposta de Biomarcadores (IBR) e análises químicas de agrotóxicos nestes ribeirões. Não surpreendente, o ribeirão Godoy, localizado dentro de um fragmento florestal ao lado de unidade de conservação (UC), apresentou um menor grau de contaminação, visto que os valores de IBR e análises químicas demonstraram níveis menos elevados dos contaminantes analisados. Desta forma, podemos inferir o efeito protetor dessa vegetação, como uma barreira ao escoamento superficial e lixiviação desses contaminantes e interceptação dos agrotóxicos aplicados via pulverização área. Entretanto, variações importantes observadas em alguns parâmetros avaliados nos peixes confinados neste local ainda sim indicam os efeitos de agrotóxicos presentes no ambiente, que podem estar chegando via atmosférica ou subterrânea. Os biomarcadores mais consistentes, facilmente observados nos gráficos de radar do IBR, são os biomarcadores de efeito, como danos oxidativos— lipoperoxidação (PCO) -danos genotóxicos (teste do cometa) e neurotóxicos (atividade da AChE). Os biomarcadores de exposição, tais como a GST, EROD, GSH apresentaram variações importantes entre as duas épocas do ano, que podem estar mais relacionadas com as variações sazonais (temperatura, pluviosidade, ressurgimento dos sedimentos). Apesar da importância destes biomarcadores, principalmente quando se necessita compreender mecanismos de toxicidade e adaptação dos organismos frente à exposição; para fins de monitoramento e diagnóstico de qualidade ambiental em áreas agrícolas não são os mais indicados. Para atender a

este objetivo, deve-se então selecionar aqueles biomarcadores mais consistentes e que dão respostas rápidas, tais como os biomarcadores de efeito acima citados.

Análises químicas que englobem uma maior gama de contaminantes (agrotóxicos) devem ser realizadas, tanto em amostras de água e sedimento dos ribeirões, em diferentes épocas do ano, a fim de se estabelecer uma melhor relação destes compostos com as respostas biológicas dos organismos, e compreender os potenciais efeitos destas misturas presentes nos ambientes aquáticos.

O capítulo 4 trouxe uma abordagem diferente, muito pouco explorada na literatura, buscando comparar respostas biológicas em peixes transplantados (testes *in situ*) e peixes residentes em áreas agrícolas. A espécie *Astyanax altiparanae* foi selecionado para este objetivo e assim como *P. lineatus* mostrou-se sensível aos efeitos dos contaminantes ambientais. Novamente os biomarcadores mais consistentes foram LPO, danos no DNA e AChE, que apresentaram respostas semelhantes tanto em peixes residentes quanto em peixes coletados nestas áreas agrícolas, confirmando ser estes os biomarcadores mais indicados no monitoramento e diagnósticos da contaminação em áreas agrícolas. Os níveis dos biomarcadores de exposição (GST e GSH) apresentaram diferenças entre os peixes confinados e residentes. Estas diferenças são de difícil interpretação, uma vez que podem estar relacionadas a fatores como adaptação e tolerância de peixes expostos cronicamente a contaminantes, fatores genéticos, nutricionais, etc. A carência de dados sobre os efeitos de misturas de agrotóxicos em condições de campo, sobretudo em populações naturais, reforçam a necessidade de mais estudos relacionados ao tema, a fim de se compreender como estas populações respondem adaptativamente à exposição crônica. As duas abordagens foram eficientes para diagnosticar a qualidade da água destes locais, embora a utilização de organismos engaiolados tenha sido mais sensível quando utilizada para discriminar e indicar um gradiente de contaminação ao longo do ribeirão.

As alterações bioquímicas e genéticas observadas neste trabalho, podem interferir, a longo prazo, em níveis mais elevados de organização biológica e, portanto de maior relevância ecológica, como alterações comportamentais, reprodutivas e de sobrevivência, que direta ou indiretamente interferem na manutenção da espécie em seu ambiente natural.

Em conjunto, os resultados deste trabalho alertam para deterioração da qualidade dos nossos corpos hídricos e para o comprometimento da saúde dos peixes residentes nestes locais. Estes resultados contribuíram com a compreensão dos efeitos agudos de agrotóxicos sobre espécies de peixes em condições de campo, bem como selecionar os biomarcadores mais sensíveis, e que, portanto podem ser incorporados e utilizados confiavelmente em programas de monitoramento e gestão de corpos d'água em áreas agrícolas.