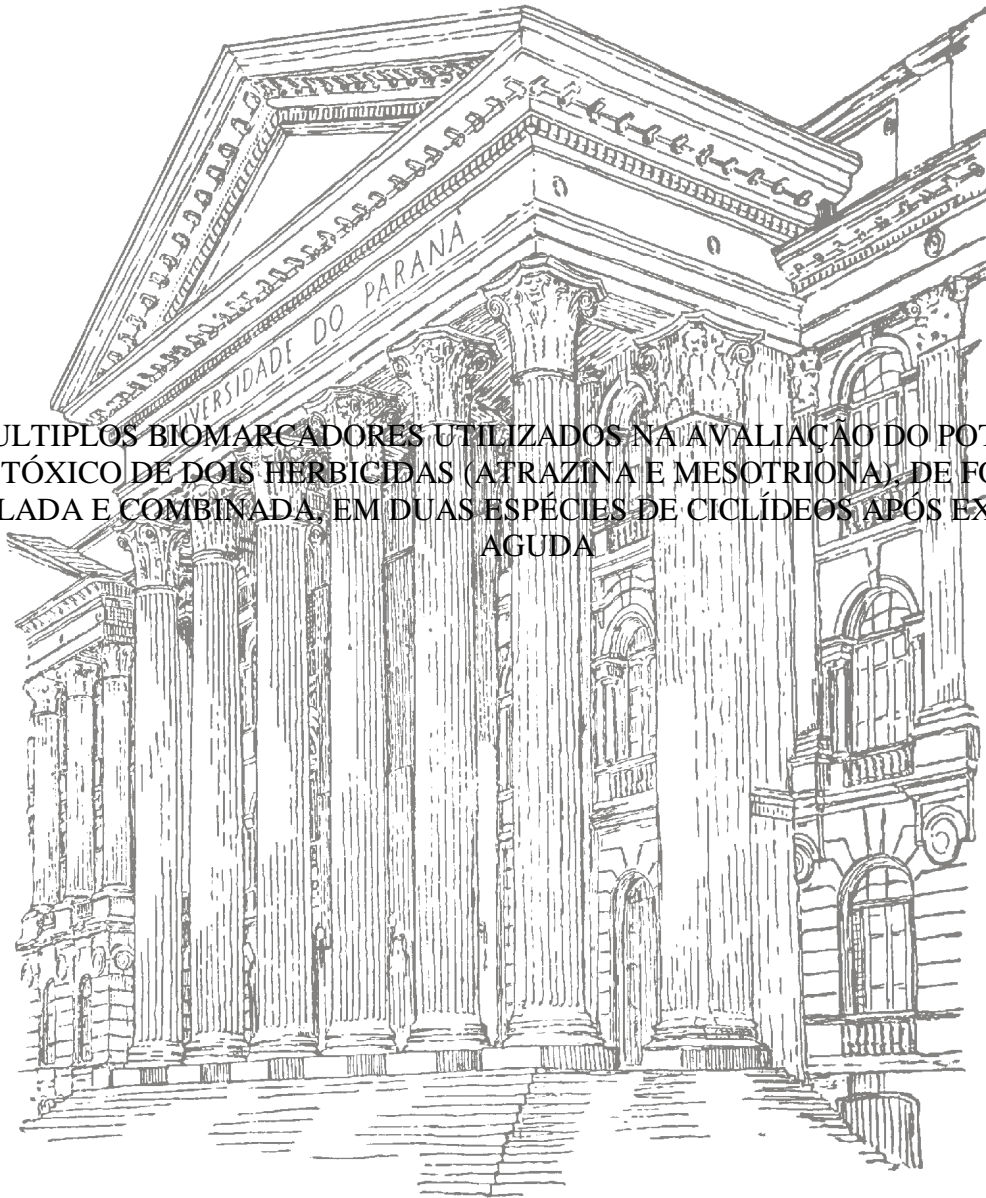


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LAERCIO DANTE STEIN PIANCINI

MÚLTIPLOS BIOMARCADORES UTILIZADOS NA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL  
TÓXICO DE DOIS HERBICIDAS (ATRAZINA E MESOTRIONA) DE FORMA  
ISOLADA E COMBINADA, EM DUAS ESPÉCIES DE CICLÍDEOS APÓS EXPOSIÇÃO  
AGUDA



CURITIBA  
2015

LAERCIO DANTE STEIN PIANCINI

MÚLTIPLOS BIOMARCADORES UTILIZADOS NA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL  
TÓXICO DE DOIS HERBICIDAS (ATRAZINA E MESOTRIONA), DE FORMA  
ISOLADA E COMBINADA, EM DUAS ESPÉCIES DE CICLÍDEOS APÓS EXPOSIÇÃO  
AGUDA

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em  
Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade  
Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção  
do título de doutor em Genética.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marta Margarete Cestari

CURITIBA  
2015



## PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado, a qual se submeteu **LAERCIO DANTE STEIN PIANCINI**, para obtenção do título de Doutor em Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira ao candidato o conceito "A".

Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 23 de abril de 2015

**Doutora Maria Aparecida Marin Morales**

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Membro Titular

**Doutora Wanessa Algarte Ramsdorf**

Universidade Federal Tecnológica do Paraná – Membro Titular

**Doutora Maritana Mela Prodocimo**

Universidade Federal do Paraná – Membro Titular

**Doutora Daniela Morais Leme**

Universidade Federal do Paraná – Membro Titular

**Doutora Marta Margarete Cestari**

Universidade Federal do Paraná – Orientadora e Presidente da Banca

Visto

**Professor Doutor Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza**  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética

**Prof<sup>o</sup> Dr. Ricardo Lehtonen R. de Souza**  
Coordenador do PPG - GEN - UFPR  
Matrícula 176702

*“The more you read,  
the more you know.*

*The more you know,  
the smarter you grow.*

*The smarter you grow,  
the stronger your voice,*

*When speaking your mind  
or making your choice.”*

Red Cedar School, East Lansing Michigan

## **Agradecimentos**

*À Profa. Dra. Marta Margarete Cestari, por 8 anos (sim OITO ANOS) de ensinamento, confiança e amizade.*

*As professoras Wanessa Algarte Ramsdorf, Helena Cristina Silva de Assis e Marina Isabel Mateus de Almeida pelo acompanhamento durante o doutorado.*

*Aos Professores membros da banca examinadora pelas colaborações.*

*À Profa. Dra. Lupe Furtado Alle, por todos os valores e ensinamentos transmitidos durante os cursos de mestrado e doutorado nessa instituição.*

*À Profa. Dra. Nina Pagnan pelo companheirismo, amizade e pela oportunidade didática enquanto bolsista REUNI.*

*Ao Prof. Dr. Gilberto Abate e a Rafael Garrett Dolatto pelas análises químicas realizadas.*

*Aos meus companheiros do UFPR Brown Spiders, por tornar meus finais de semana muito mais divertidos e agradáveis... Em especial aos caras dos tempos da banda... Alemão, Candioto, Diogão, Fracaro, Hamann, Hulyan, Leo e Nelson.*

*Aos meus amigos de todas as horas, desde a graduação até hoje, Marcel, Flávio, Luís Felipe e David.*

*Aos meus colegas da turma de mestrado e doutorado, por todas os momentos de companheirismo, estudos, lazer.*

*À todos colegas do Laboratório de Citogenética Animal, em especial à Gabi, Taynah, Toni, Gustavo e Flávio.... São anos de ajuda mútua, onde aprendemos muito juntos.*

*Aos estagiários e técnicos que passaram durante esses anos pelo laboratório. Sem vocês a realização desse trabalho seria muito mais árdua. Em especial à Helyandra, pelas análises realizadas.*

*À Natália, por todo amor, dedicação e companheirismo... além de grande ajuda no laboratório*

*À minha família, por todo apoio em todas as horas. Essa tese é dedicada a vocês.*

# SUMÁRIO

Lista de Figuras .....	viii
Lista de Tabelas.....	x
Lista de Abreviaturas.....	xi
RESUMO .....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 AGROTÓXICOS.....	3
1.2 ATRAZINA.....	4
1.3 MESOTRIONA.....	6
1.4 MISTURAS DE PESTICIDAS.....	7
1.5 BIOINDICADORES.....	9
1.6 BIOMARCADORES.....	11
2. OBJETIVOS.....	18
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
3.1 CAPÍTULO I.....	21
Comparação da resposta de toxicidade entre uma espécie de peixe nativa e uma introduzida expostas à atrazina.....	21
3.2 CAPÍTULO II.....	44
Herbicida mesotriona promove alterações bioquímicas e danos ao dna em duas espécies de peixes.....	44
3.3 CAPÍTULO III.....	61
Avaliação aguda do potencial genotóxico e de indução de estresse oxidativo da mistura dos herbicidas atrazina e mestriona em duas espécies de ciclídeos.....	61

4.	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	82
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
6.	ANEXOS.....	99

## Lista de Figuras

<b>Figura 1:</b> Fórmula estrutural da Atrazina.....	5
<b>Figura 2:</b> Fórmula estrutural da mesotriona.....	6
<b>Figura 3:</b> Exemplar de <i>Geophagus brasiliensis</i> . Fonte: O Autor.....	11
<b>Figura 4:</b> Exemplar de <i>Oreochormis niloticus</i> . Fonte: O autor.....	12

### Artigo I

<b>Figura 1:</b> Escores do ensaio cometa de (A) eritrócitos, (B) fígado e (C) brânquias de <i>O. niloticus</i> expostas à ATZ.....	31
<b>Figura 2:</b> Análises bioquímicas em <i>O. niloticus</i> expostas à atrazina. (A) GST, (B) SOD. (C) GPx, (D) GSH, (E) LPO e (F) PCO.....	32
<b>Figura 3:</b> Escores do ensaio cometa de (A) eritrócitos, (B) fígado e (C) brânquias de <i>G. brasiliensis</i> expostas à ATZ.....	33
<b>Figura 4:</b> Análises bioquímicas em <i>G. brasiliensis</i> expostas à atrazina. (A) GST, (B) SOD. (C) GPx, (D) GSH, (E) LPO e (F) PCO.....	34

### Artigo II

<b>Figura 1:</b> Escores do ensaio cometa de (A) eritrócitos, (B) fígado e (C) brânquias de <i>O. niloticus</i> expostas à mesotriona.....	52
<b>Figura 2:</b> Análises bioquímicas em <i>O. niloticus</i> expostas à mesotriona. (A) GST, (B) SOD, (C) GPx, (D) GSH, (E) LPO e (F) PCO.....	53
<b>Figura 3:</b> Escores do ensaio cometa de (A) eritrócitos, (B) fígado e (C) brânquias de <i>G. brasiliensis</i> expostas à mesotriona.....	54



**Figura 4:** Análises bioquímicas em *G. brasiliensis* expostos à mesotriona. (A) GST, (B) SOD, (C) GPx, (D) GSH, (E) LPO e (F) PCO.....55

### Artigo III

**Figura 1:** Escores do ensaio cometa de (A) eritrócitos, (B) fígado e (C) brânquias de *O. niloticus* expostos à três diferentes misturas de atrazina e mesotriona.....70

**Figura 2:** Análises bioquímicas em *O. niloticus* expostos à três diferentes misturas de atrazina e mesotriona. (A) GST, (B) SOD, (C) GPx, (D) GSH, (E) LPO e (F) PCO.....72

**Figura 3:** Escores do ensaio cometa de (A) eritrócitos, (B) fígado e (C) brânquias de *G. brasiliensis* expostos à três diferentes misturas de atrazina e mesotriona.....73

**Figura 4:** Análises bioquímicas em *G. brasiliensis* expostos à três diferentes misturas de atrazina e mesotriona. (A) GST, (B) SOD, (C) GPx, (D) GSH, (E) LPO e (F) PCO.74

## Lista de Tabelas

### Artigo I

<b>TABELA 1</b> – Diferenças de respostas entre as espécies frente a exposição com atrazina.....	36
---	----

### Artigo II

<b>TABELA 1</b> – Concentrações dos herbicidas nos diferentes tratamentos nas espécies <i>O. niloticus</i> e <i>G. brasiliensis</i> .....	66
---	----

### Artigo III

<b>TABELA 1</b> - Frequências das alterações morfológicas nucleares, micronúcleos e eritrócitos policromáticos em <i>O. niloticus</i> expostos a três diferentes misturas de atrazina e mesotriona.....	71
---	----

<b>TABELA 2</b> - Frequências das alterações morfológicas nucleares, micronúcleos e eritrócitos policromáticos em <i>G. brasiliensis</i> expostos a três diferentes misturas de atrazina e mesotriona.....	74
--	----

## Lista de Abreviaturas

- AMBA – *2-amino-4- methylsulfonylbenzoic acid*
- AMN – Alterações morfológicas nucleares
- ATP – Adenosina trifosfato
- ATZ – Atrazina
- BL – *Blebed*
- BN - Binúcleo
- CAT – Catalase
- CL<sub>50</sub> – Concentração letal média
- CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente
- CYP450 – Citocromo P450
- DNOC - 2-metil-3,5-dinitrofenol
- DNPH - 2,4 dinitrofenilhidrazina
- ECB - Ensaio cometa com brânquias
- ECE - Ensaio cometa com eritrócitos
- ECF – Ensaio cometa com fígado
- ERO – Espécie reativa de oxigênio
- GPx - Glutathione peroxidase
- GR – Glutathione reductase
- GSH - Glutathione reduzida
- GSSG - Glutathione oxidada
- GST - Glutathione S-transferases
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- LPO – Peroxidação lipídica
- MESO – Mesotriona

MMS – Metil metano sulfonato

MN – Micronúcleo

MNBA – *4-methylsulfonyl-2-nitrobenzoic acid*

MNT - Teste do micronúcleo písceo

NT - *Notched*

PBS – Tampão fosfato

PCE – Eritrócitos imaturos

PCO – Carbonilação de proteínas

POLI – Eritrócitos policromáticos

SBF – Soro bovino fetal

SINDAG - Sindicato nacional da indústria para produtos de defesa agrícola

SOD - Superóxido dismutase

US-EPA - *United States Environmental Protection Agency*

VC - Vacúolos

## RESUMO

O herbicida atrazina tem um amplo potencial de contaminação ao meio ambiente e é um agente reconhecidamente danoso a saúde de diversas espécies de peixes. A mesotriona está entre os novos herbicidas que surgiram como alternativa após o banimento da atrazina na Europa. Por outro lado, a mistura de herbicidas tem sido utilizada como uma alternativa visando aumentar o espectro de controle das plantas daninhas e a eficácia dos herbicidas. Em anos recentes, cresceu o número de pesquisas utilizando peixes neotropicais na avaliação de substâncias potencialmente tóxicas, ou em estudos de monitoramento ambiental. Esses animais são suscetíveis a exposição a químicos e misturas provenientes de atividades agrícolas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial tóxico, através de múltiplos biomarcadores, dos herbicidas atrazina e mesotriona de forma isolada e combinada em bioensaios de exposição aguda por 96 horas. Além disso, esclarecer se existem diferenças de sensibilidade a esses herbicidas entre duas espécies da família Cichlidae, *Geophagus brasiliensis* e *Oreochromis niloticus*. Na exposição ao herbicida atrazina, *G. brasiliensis* apresentou níveis basais de estresse oxidativo e quebras ao DNA maiores do que *O. niloticus*. A espécie *O. niloticus* se mostrou mais adequada para ser utilizada em bioensaios utilizando biomarcadores bioquímicos e de genotoxicidade. Na exposição ao herbicida mesotriona, *O. niloticus* e *G. brasiliensis* apresentaram danos genéticos e alterações na resposta de enzimas de controle a ERO e aumento de LPO quando expostas a esse xenobiótico. A mistura entre os herbicidas causou poucas alterações de resposta a ERO, no entanto ocorreu danos ao material genético de ambas as espécies em concentrações que quando isoladas não causam tal efeito. Dessa forma, concluímos que ambos herbicidas causam efeitos adversos as espécies de forma isolada, e quando misturados ocorrem efeitos sinérgicos, alterando suas propriedades tóxicas. Ainda, *O. niloticus* se mostrou mais adequada em ensaios de toxicidade com marcadores genéticos e bioquímicos.

## ABSTRACT

The herbicide atrazine has large potential to contamination of the environment and is an agent known to be harmful various fish species. Mesotrione is a new herbicides that have emerged as an alternative after the ban on Atrazine in Europe. On the other hand, the mixture of herbicides has been used as an alternative to increase the herbicidal efficacy. In recent years, increased the number of researches using neotropical fish in the evaluation of potentially toxic substances, or environmental monitoring studies. These animals are susceptible to exposure to chemical mixtures from agricultural activities. The objective of this study was to evaluate the toxic potential through multiple biomarkers, the herbicides atrazine and mesotrione, isolated and combined, in bioassays of acute exposure for 96 hours. Also, clarify whether there are differences of sensitivity to these herbicides between two species of cichlid family, *Geophagus brasiliensis* and *Oreochromis niloticus*. In the exposure to atrazine, *G. brasiliensis* showed basal levels of oxidative stress and DNA breaks to larger than *O. niloticus*. The *O. niloticus* species was more suitable for use in bioassays using biochemical and genetics biomarkers. In the exposure to mesotrione herbicide, *O. niloticus* and *G. brasiliensis* showed genetic damage and changes in the control of enzymes response to ROS and increased LPO when exposed to this xenobiotic. The mixture of the herbicides caused little change in the ROS response, however we observe DNA damage in both species in concentrations which when the isolated herbicides do not cause any damage. Thus, we conclude that both herbicides cause adverse effects the species when isolated, and when mixed. Synergistic effects occur, changing its toxic properties. Moreover, *O. niloticus* was more suitable for toxicity testing using genetic and biochemical biomarkers.

## **PREFÁCIO**

Essa tese é uma compilação de uma revisão bibliográfica e de três capítulos que tratam sobre contaminação de peixes das espécies *Geophagus brasiliensis*, o acará, e *Oreochromis niloticus*, a tilápia, com dois herbicidas diferentes, a atrazina e a mesotriona. A revisão bibliográfica, ou introdução geral, traz ao leitor uma ambientação sobre o contexto da contaminação dos recursos hídricos, bem como da utilização de defensivos agrícolas, em especial dos dois herbicidas pesquisados e a mistura entre eles. Uma boa noção sobre o uso de biomarcadores genéticos e bioquímicos utilizados nesse trabalho podem ser obtidas na introdução geral, e também informações básicas a respeito das espécies utilizadas como bioindicadores.

O Capítulo I trata da comparação da resposta entre as espécies frente a um xenobiótico extensamente utilizado em estudos de toxicidade, a atrazina. Esse capítulo traz informações relevantes, pois a quantidade de estudos utilizando espécies da região neotropical, como o acará, em ensaios de toxicidade aumenta ano a ano. Tais estudos mostram que essas espécies apresentam boa sensibilidade a contaminação ambiental, podendo ser excelentes organismos teste em bioensaios e biomonitoramentos.

O capítulo II traz ao leitor informações a respeito da toxicidade do herbicida mesotriona. Tal herbicida é extensamente utilizado em cultivos de milho, principalmente na Europa, pois naquele continente a utilização da atrazina foi proibida a partir de 2004, e a mesotriona surgiu como uma das alternativas no controle de ervas daninhas em cultivares. Existem poucos relatos na literatura a respeito de efeitos adversos desse composto a espécies não alvo, e nenhum trabalho utilizando biomarcadores em peixes havia sido realizado com ele, até o presente momento.

Nos demais continentes onde a utilização da atrazina não foi proibida, a mesotriona também é utilizada. Nesse caso em mistura com a atrazina ou outros

herbicidas. Essa mistura garante ao produtor agrícola uma maior eficácia no controle de ervas daninhas. O capítulo III desse documento é um relato sobre os efeitos adversos que essa mistura pode causar em *G. brasiliensis* e *O. niloticus* uma vez que misturas de compostos podem aumentar ou diminuir o potencial tóxico em relação aos herbicidas isolados.



## 1. INTRODUÇÃO

As águas superficiais vêm recebendo grandes quantidades de águas residuais de origem doméstica, industrial, agrícola, hospitalar e estações de tratamento. Estes resíduos têm propriedades físico-químicas e microbiológicas bastante variadas que alteram a qualidade da água e degradam o ambiente receptor, pondo em risco a saúde humana e biota associada.

Nossa espécie está sob constante exposição a substâncias químicas presentes em produtos de consumo, como medicamentos, alimentos, produtos de higiene pessoal, de limpeza e cosméticos, além da poluição ambiental, bem como diversas fontes de radiação natural. Destes agentes físico-químicos, apenas uma parcela possui estudos que avaliam seus efeitos sobre os humanos e outros organismos (FERRARO, 2009).

A maioria dos recursos biológicos da Terra estão localizados em regiões específicas do globo, como os ambientes costeiros e os grandes sistemas de bacias fluviais. No entanto, mais de 3 bilhões de pessoas vivem em estreita proximidade desses locais, e em grande parte dependendo deles para retirar alimentos e matérias primas industriais. Como consequência dessa situação, grande parte dos resíduos gerados, tanto industriais como domésticos, ocorrem nessas áreas, que possuem maior importância biológica e econômica, comprometendo esses recursos e também a qualidade de vida humana (MOORE et al., 2004).

Durante as três últimas décadas observou-se um aumento no interesse da comunidade científica e das agências regulatórias em relação à detecção, conhecimento e controle sobre os agentes ambientais responsáveis por danos à saúde humana e à sustentabilidade dos ecossistemas (DA SILVA et al., 2003). Este interesse foi

intensificado em razão do constante crescimento populacional e o conseqüente aumento da industrialização, bem como a utilização inadequada de recursos naturais.

Desde os anos sessenta a humanidade têm consciência do potencial de muitos produtos químicos em causar efeitos adversos para ecossistemas aquáticos e terrestres, em particular. O destino final de muitos destes contaminantes é o ambiente aquático, devido ao uso direto ou processos hidrológicos e atmosféricos (STEGEMAN e HAHN, 1994). A presença de xenobióticos em um ambiente aquático não é, por si só, indicativo de efeitos prejudiciais. Ligações entre a presença de compostos xenobióticos no ecossistema, o nível de exposição externa e os níveis de contaminação de tecidos devem ser estabelecidos. Muitos compostos hidrofóbicos, e seus metabólitos, que chegam aos ecossistemas aquáticos ainda precisam ser identificados, e seu impacto a vida aquática ainda não foi determinado. Dessa forma, toxicologistas ambientais vêm estudando extensivamente os efeitos de contaminantes químicos ou poluentes neste ambiente (VAN DER OOST et al., 2003).

A simples detecção de contaminantes nos compartimentos abióticos e bióticos não é suficiente, a menos que seus efeitos biológicos ou ecológicos sejam devidamente avaliados. Contaminantes presentes no ambiente, muitas vezes, ocorrem como misturas complexas, e o risco real de exposição difere da avaliação de uma substância específica (JHA, 2008). Assim, torna-se necessária a utilização de ensaios ecotoxicológicos aliados a análises físico-químicas para a avaliação holística de misturas complexas, especialmente pelos efeitos sinérgicos, aditivos e efeitos antagonistas que podem ocorrer.

## 1.1 AGROTÓXICOS

Os pesticidas são produtos químicos amplamente utilizados na agricultura para o combate de pragas. Os herbicidas são agentes utilizados para destruir plantas daninhas e tiveram sua utilização intensificada a partir de 1.800 d.C. com o uso de herbicidas inorgânicos (como sulfato de cobre, sulfato de amônio, arsenito de sódio e clorato de potássio) na agricultura, pois com o cultivo de plantas de uma mesma espécie, teve início, também, o desenvolvimento de pestes e pragas na agricultura. O DNOC (2-metil-3,5-dinitrofenol) foi o primeiro herbicida orgânico empregado, produzido em 1935 e à partir da década de 40 seguiu-se uma crescente produção e diversificação de herbicidas (JACOMINI, 2002).

Grave desequilíbrio no solo e desenvolvimento de plantas e insetos indesejáveis foram alguns dos problemas que surgiram com a implantação da agricultura moderna industrial, onde extensas áreas naturais têm sido substituídas por monoculturas. Assim, passaram a ser utilizados diversos agroquímicos, entre fertilizantes e pesticidas, o que tornou a agricultura uma das principais fontes de contaminação aquática (KLEMZ, 2002).

Em 2012, segundo o sindicato nacional da indústria para produtos de defesa agrícola (SINDAG), 823 mil toneladas de pesticidas foram comercializados no Brasil, sendo que os herbicidas são os produtos mais vendidos, correspondendo a 57% desse mercado. Desse montante, aproximadamente 40 a 50% dos produtos correspondem aos seus respectivos ingredientes ativos. Os principais cultivares consumidores de defensores agrícolas em nosso país são a soja, cana-de-açúcar, milho e algodão, que correspondem a 47%, 12,8%, 9,4% e 9,3% do mercado, respectivamente (SINDAG, 2012).

Os ambientes aquáticos e sua biota são os que mais sofrem com a contaminação por agrotóxicos, uma vez que a contaminação desses ambientes ocorre facilmente pela aplicação direta do produto na água em pisciculturas, lavagem de resíduos e embalagens,

além do escoamento superficial, deriva e infiltração, chegando aos lençóis freáticos (TOMITA e BEYRUTH, 2002).

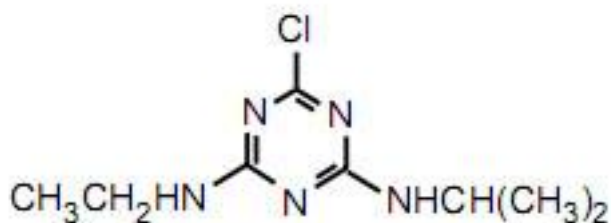
Além do princípio ativo, a formulação dos agrotóxicos contém os agentes de dispersão e solubilizantes, também chamados de surfactantes ou substâncias inertes. Esses componentes não tem função pesticida, porém, podem ser biologicamente ativos e por vezes são esses os componentes mais tóxicos da fórmula (BOLOGNESI, 2003). Muitos desses compostos são poderosos solventes orgânicos como xilenos, toluenos, álcoois, cetonas, formaldeídos, benzenos, ácidos, entre outros, que possuem atividade tóxica bastante alta (GRISOLIA, 2005).

Agrotóxicos são um bom modelo para estudos da ecotoxicologia, pois eles contaminam a atmosfera, terra e água, sendo persistentes no meio ambiente. Entram nas cadeias ecológicas e nos ciclos biogeoquímicos, dispersando-se e causando efeitos tóxicos e adversos desde as bactérias até o homem (GRISOLIA, 2005).

## 1.2 ATRAZINA

As triazinas são um grupo de herbicidas químicos similares, registrados em 1955, como a atrazina, cianazina, propazina, ametrina e simazina, usadas para o controle de ervas daninhas, devido à capacidade desse composto de inibir a fotossíntese (JACOMINI, 2002), bloqueando o transporte de elétrons e levando a morte da planta por falta de energia. Em animais, os efeitos das triazinas são semelhantes, afetando a respiração celular pela inibição da síntese de ATP (THOMPSON, 1974). Os herbicidas triazínicos têm amplo potencial de contaminação de diferentes compartimentos ambientais em virtude de suas características, tais como: alto potencial de lixiviação e escoamento, elevada persistência em solos, hidrólise lenta, baixa solubilidade em água e absorção moderada à matéria orgânica (GRISOLIA, 2005).

O 2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina (fig. 1), ou atrazina, é um sólido cristalino branco, com um grupo químico básico (SOLOMON et al., 1996). Em anos recentes, aumentou a preocupação acerca da persistência da atrazina no ambiente (LONDOÑO, 2005). Pesquisas realizadas na Itália e nos Estados Unidos (Califórnia) demonstram que a atrazina é um dos poluentes mais comuns em águas superficiais e subterrâneas (COVA et al., 1989). Devido ao seu uso extenso e sua alta persistência em águas subterrâneas, a US-EPA (*United States Environmental Protection Agency*) classificam a atrazina como o herbicida triazínico mais presente nas águas subterrâneas dos Estados Unidos. Estima-se que entre 2 a 3 milhões de estadunidenses, que utilizavam água de lençol freático no abastecimento doméstico, estão expostos a  $0,2 \mu\text{g.L}^{-1}$  de ATZ, que tem grande estabilidade em águas subterrâneas (KLIGERMAN et al., 2000). No Brasil, constatou-se concentrações de ATZ de  $2,7 \mu\text{g.L}^{-1}$  em rios próximos a áreas agrícolas, concentração esta que se encontra acima da permitida pela legislação brasileira para águas com fins de preservação,  $2 \mu\text{g.L}^{-1}$  (ARMAS et al., 2007; BRASIL, 2005).



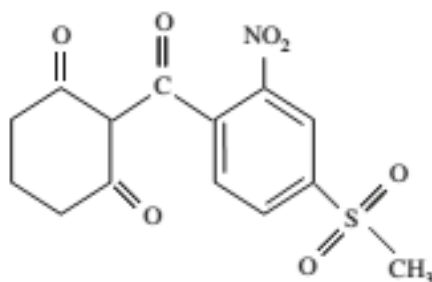
**Figura 1:** Fórmula estrutural da Atrazina. Adaptado de COX, 2001.

Devido ao fato de que a concentração de ATZ, ou seus produtos de degradação, em águas subterrâneas em muitos locais na Europa já ultrapassava  $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ , a União Europeia, no ano de 2004, decidiu retirar do mercado qualquer produto que contivesse a ATZ, pois o uso contínuo desse herbicida poderia comprometer a recuperação da qualidade das águas subterrâneas. No entanto, no resto do mundo a ATZ continua sendo utilizada sem restrições (SALABERRIA et al., 2009).

Em anos recentes, ocorreu no Brasil um grande esforço por parte de diversos pesquisadores em evidenciar os efeitos tóxicos desse composto em peixes, principalmente em espécies neotropicais. Efeitos genotóxicos causados pela exposição a atrazina foram encontrados em *Rhamdia quelen* (PIANCINI, 2011), *Oreochromis niloticus* (VENTURA et al., 2008) e *Prochilodus lineatus* (SANTOS e MARTINEZ, 2012). Foram encontrados danos ao fígado e brânquias, alterações na atividade de enzimas de resposta ao estresse oxidativo, além de distúrbios na função osmorregulatória em *R. quelen* (MELA et al., 2013a). Paulino et al. (2012a) descreveram alterações no balanço iônico em brânquias de *Prochilodus lineatus*. Em outro trabalho do mesmo autor, com essa mesma espécie, foram encontrados danos histopatológicos e alterações na atividade de enzimas de resposta a espécies reativas de oxigênio (ERO) (PAULINO et al., 2012b).

### 1.3 MESOTRIONA

Dentre os herbicidas registrados para a cultura do milho encontra-se a mesotriona (2-(4-metil-2-nitrobenzoi) ciclohexano-1,3-diona; fig. 2), pertencente ao grupo químico das tricetonas. É classificado como herbicida seletivo, com aplicação em pós-emergência para o controle de folhas largas anuais e gramíneas na cultura do milho (JOHNSON et al., 2002).



**Figura 2:** Fórmula estrutural da mesotriona. Fonte: BONNET et al. (2008).

A mesotriona é obtida através do isolamento de um aleloquímico leptospermone secretado pela planta da espécie *Callistemon citrinus* (FREITAS et al., 2004). Os aleloquímicos são compostos químicos secretados por um determinado organismo, capazes de inibir ou estimular seu desenvolvimento e/ou crescimento de outros componentes do ambiente (RICE, 1984). Estes compostos podem ser encontrados nas sementes, folhas, caules e raízes das plantas em quantidades variáveis (PEIXOTO, 1999).

Mesotriona é pouco estável no ambiente, e é detectado no solo e água apenas por curto período de tempo após sua aplicação (BARCHANSKA et al., 2012). Devido a essas características químicas e ao banimento da atrazina pela União Europeia em 2004 este composto ganhou um grande mercado desde então.

Por ser uma substância relativamente nova no mercado, existem pouquíssimos trabalhos testaram possíveis efeitos tóxicos desse composto. Bonnet et al. (2008) testaram a toxicidade do mesotrione, de dois metabólitos (MNBA e AMBA), e do produto formulado Callisto® em duas espécies de microorganismos. Valiente Moro et al. (2012) testaram os efeitos desse composto em 3 espécies de microalgas. Crouzet et al. (2010) testaram possíveis efeitos sobre a comunidade microbiana do solo e Kreutz et al. (2008) avaliaram a  $CL_{50}$  desse composto em *Rhamdia quelen*, um peixe neotropical. Nenhum trabalho utilizando biomarcadores foi realizado em qualquer espécie de peixes.

#### 1.4 MISTURAS DE PESTICIDAS

A cultura do milho está entre as mais importantes do Brasil com uma área plantada em torno de 14 milhões de hectares e produtividade média de 3.670 kg/ha (IBGE, 2009). As condições edafoclimáticas destacam o Brasil como um país de grande potencial para a cultura do milho, entretanto, o clima tropical é também muito propício à ocorrência de

uma grande quantidade de plantas daninhas. Existem diversos métodos para se controlar as plantas daninhas na agricultura. Os métodos mais utilizados são os mecânicos e o controle químico, e a mistura de herbicidas tem sido utilizada como uma alternativa visando aumentar o espectro de controle das plantas daninhas e a eficácia dos herbicidas (ZAGONEL, 2007).

Entretanto, diante de diversas fontes de poluição, Agrawal et al. (2010) destacam que mais de 50% da poluição de córregos e rios é decorrente da lixiviação e mistura de produtos químicos usados nas práticas agrícolas. Quando em contato com o ambiente aquático, esses produtos podem se fixar na matéria em suspensão, se depositar no sedimento ou ser absorvidos pelos organismos e, com o fluxo contínuo entre agrotóxico e água/sedimento, esse tipo de poluente se torna um dos principais contaminantes de ambientes aquáticos por estar em contato com o meio por tempos relativamente longos (TOMITA e BEYRUTH, 2002).

Diversos pesticidas e contaminantes são frequentemente encontrados em baixas concentrações ao longo do ano, sendo que herbicidas são detectados em cerca de 70-90% das amostras na América do Norte (BRODEUR et al., 2014). ATZ é utilizada desde os anos 1950 em diversos cultivares (AZEVEDO et al., 2004), apesar de esse herbicida ter um amplo potencial de contaminação em diferentes compartimentos do meio ambiente (BOLOGNESI, 2003), sendo que foram detectadas em águas de escoamento em concentrações de 0,2 a 20  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (SELIM, 2003), enquanto que em córregos e rios adjacentes a áreas de cultivo esse valor pode alcançar até 1000  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (GRAYMORE et al., 2001).

Para substituir a ATZ, diversos herbicidas seletivos foram desenvolvidos, como o Mesotriona, *S-metolachlor*, *benoxacor* e *nicosulfuron*. Esses produtos pertencem a diferentes famílias e tem diferentes modos de ação (JOLY et al., 2013). No entanto, nos



países onde a ATZ não foi banida, esses herbicidas também ganharam espaço, porém não como substitutos da ATZ e sim como um herbicida adicional sendo utilizado em conjunto com a ATZ para que o espectro de ação herbicida da aplicação em campo seja ampliado (JAMES et al., 2006; ZAGONEL e FERNANDES, 2007).

### 1.5 BIOINDICADORES

Os bioindicadores representam os modelos animais utilizados em estudos para avaliar os efeitos do tóxicos causado pela exposição a um determinado xenobiótico, ou a uma mistura destes. Um bom bioindicador deve apresentar sensibilidade ao contaminante que está exposto, além de ser uma espécie abundante no ambiente e ter facilidade em adaptar-se aos ensaios laboratoriais (YAMAMOTO, 2011).

Dentre os principais organismos utilizados como bioindicadores estão espécies de moluscos (SANTOS e MARTINEZ, 2014), peixes (PIANCINI, 2011), anfíbios (HAYES et al., 2002), mamíferos (COTELLE e FÉRARD, 1999) e algas (AOYAMA et al., 2003). Os peixes são amplamente utilizados por apresentarem respostas similares aos grandes vertebrados aos agentes tóxicos, além de serem um dos principais vetores de transferência de contaminantes da água para humanos (AL-SABTI; METCALFE, 1995). Além disso, os peixes, assim como mamíferos, sofrem bioacumulação, são capazes de responder a agentes químicos em baixas concentrações e são capazes de ativar o sistema enzimático do citocromo P450 (DA SILVA et al., 2003).

*Cichlidae* é uma numerosa família dentro da ordem Perciformes, compreendendo cerca de 1.350 espécies atualmente reconhecidas, contudo, é estimado um número superior a 2.000 espécies. Trata-se de um importante grupo de peixes da Região Neotropical, representando de 6% a 10% de peixes de água doce dessa fauna, totalizando aproximadamente 400 espécies nessa região (KULLANDER, 2003).

Os ciclídeos são representados por peixes muito versáteis, territorialistas e resistentes, com predileção por ambientes lênticos, principalmente lagos e lagoas. Quanto à alimentação, possuem hábitos muito diversificados, podendo se alimentar do lodo depositado no fundo, de peixes, gastrópodos, tecamebas, microcrustáceos e larvas de insetos (BENINCÁ, 2006).

*Geophagus brasiliensis* (acará, fig. 3) é um ciclídeo, muito comum em lagos e reservatórios da região Central e Sul do Brasil (SCHWANTES; BARTLETTI; SCHWANTES, 1991), sendo uma espécie abundante no período de verão, em ambientes de fundos lodosos, com reprodução entre final de verão e início de outono. Essa espécie é comumente utilizada como bioindicador em monitoramentos ambientais com diversos biomarcadores (BENINCÁ et al., 2012; OSÓRIO et al., 2013; VOIGT et al., 2014).



**Figura 3:** Exemplar de *Geophagus brasiliensis*. Fonte: O autor.

Apesar de não se tratar de uma espécie nativa, *Oreochromis niloticus* (fig. 4) é amplamente distribuída nos reservatórios brasileiros e cultivada em piscicultura, sendo muito utilizada na alimentação humana. Diversos trabalhos utilizando *O. niloticus* como bioindicador são realizados ao redor do mundo, relacionando exposição a xenobióticos com respostas adversas no organismo (HUSSEIN et al., 1996; CAVAŞ e ERGENE-

GÖZÜKARA, 2005; ERGENE et al., 2007; VENTURA et al., 2008; SOUZA e FONTANETTI, 2012; AMORIM et al., 2013).



**Figura 4:** Exemplo de *Oreochromis niloticus*. Fonte: O autor.

## 1.6 BIOMARCADORES

Biomarcadores são respostas moleculares, celulares ou sistêmicas mensuráveis utilizadas para indicar a exposição ou efeito de alguma substância sobre o organismo estudado. Eles podem ser definidos como as alterações biológicas que expressam a exposição e/ou efeito tóxicos de poluentes presentes no ambiente (WALKER et al., 1996).

Respostas biológicas a agressões ambientais podem ser evidenciadas em diversos níveis de organização, desde ecossistemas até compartimento subcelulares ou reações químicas intracelulares, passando por comunidades, populações, espécies, organismos e células (WALKER et al., 1996)

Alterações na estrutura e função dos ecossistemas são as formas mais relevantes do ponto de vista ecológico para avaliar toxicidade de contaminantes sobre o ambiente (KELLY e HARWELL, 1989). No entanto, quando uma alteração significativa é observada no ecossistema, este já sofreu danos muito severos, e é impossível relacionar concentrações de poluentes a determinados graus de alterações ambientais (NASCIMENTO, PEREIRA e LEITE, 2006).

Os efeitos iniciais causados pelos poluentes são observados nos níveis organizacionais mais basais, nas respostas bioquímicas e moleculares. Nesse estágio de contaminação as alterações causadas pelos poluentes podem ser reversíveis, de forma que medidas preventivas possam ser tomadas evitando o comprometimento mais severo do ambiente. Dessa forma, devem ser utilizados biomarcadores moleculares, bioquímicos, fisiológicos e histológicos capazes de indicar diferentes respostas à presença de estressores distintos (HUGGETT, 1992).

#### *Biomarcadores Genéticos*

As alterações estruturais nos cromossomos ou nas sequências de pares de bases do DNA pela exposição a agentes tóxicos podem ser referidos como genotoxicidade (AL-SABTI; METCALFE, 1995). Uma vez que as mutações são frequentemente associadas com o desenvolvimento de cânceres e defeitos ao nascimento, o conhecimento do potencial genotóxico de um agente químico industrializado ou naturalmente presente no ambiente é uma informação essencial para as agências regulatórias, no que se refere ao estabelecimento de perigo para o homem e organismos aquáticos.

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 de DNA, ensaio cometa (que avalia lesões primárias no DNA) e medição da frequência de micronúcleo e outras anomalias nucleares (BOMBAIL et al., 2001).

O teste do micronúcleo foi inicialmente proposto, independentemente, por Heddle (1973) e Schmid (1975) como uma alternativa às técnicas citogenéticas clássicas para se avaliar danos cromossômicos *in vivo* em populações de células em divisão, como as da medula óssea (FENECH, 2000). Micronúcleos são formados pela condensação de fragmentos de cromossomos acêntricos ou cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal depois da anáfase (AL-SABTI e METCALFE, 1995).

O uso do teste do micronúcleo utilizando a coloração com Giemsa é o método mais utilizado em peixes, porém não possibilita a diferenciação entre eritrócitos jovens e maduros. De acordo com Ueda et al. (1992), essa distinção não é importante para avaliar o efeito crônico dos contaminantes, no entanto, observar apenas eritrócitos jovens proporcionaria um sistema de ensaio mais sensível principalmente para avaliação de efeitos agudos, em função da cinética da formação dos micronúcleos.

Os danos mais importantes em nível molecular são, sem dúvida, os vários tipos de danos causados ao DNA, incluindo as quebras, que são facilmente visualizadas através do ensaio cometa (JHA, 2008). O atual consenso científico é de que o ensaio é simples, rápido, de baixo custo e sensível. No entanto, uma das principais críticas à técnica, é a de que as quebras ao DNA podem não estar relacionadas a uma exposição específica, diferentemente do que ocorre com a formação de aductos de DNA, que estão diretamente relacionados a presença de poluentes específicos. Contudo, a relativa simplicidade do ensaio cometa quando comparado às sofisticadas técnicas de determinação de adutos de

DNA, fazem com que o teste seja uma ferramenta interessante para se avaliar danos globais ao DNA (BELPAEME et al., 1998).

### *Biomarcadores Bioquímicos*

O uso de biomarcadores bioquímicos oferece algumas vantagens, pois são, normalmente, os primeiros a serem alterados, apresentam boa sensibilidade, relativa especificidade e baixo custo de análise, quando comparados às análises químicas. Pela análise destes parâmetros pode-se: detectar precocemente a existência de contaminação por substâncias tóxicas, biologicamente significativas; identificar que espécies ou populações encontram-se em risco de contaminação; a magnitude da contaminação e o grau de severidade dos efeitos causados pelos xenobióticos (STEGEMAN; HAHN, 1994).

A biotransformação dos compostos químicos nos organismos é fundamental para alterar a atividade biológica do composto e, conseqüentemente, cessar ou potencializar a interação entre o xenobiótico e a célula. O metabolismo de xenobióticos inclui numerosos sistemas enzimáticos diferentes, os quais atuam em diversos tipos de substratos. Os principais grupos de enzimas envolvidos nas reações iniciais de metabolismo de xenobióticos (fase I, bioativação) são as monooxigenases flavoproteínas e heme proteínas. As enzimas do CYP450 são heme proteínas que metabolizam os compostos da forma lipofílica a hidrofílica. Essas reações são a fase inicial de desintoxicação e excreção, mas muitas vezes liberam metabólitos reativos ou tóxicos (STEGEMAN e HAHN, 1994).

Na Fase II (detoxificação) do metabolismo de xenobióticos, as enzimas mais estudadas são as glutathione S-transferases (GST), UDP-glucuronosiltransferases e sulfotransferases (HUGGETT et al., 1992). Enzimas de Fase II podem ser utilizadas como

biomarcadores tanto de exposição como de efeito, por serem alteradas por vários xenobióticos.

A GST é uma enzima essencial na proteção contra danos de compostos potencialmente reativos, conjugando-os para posteriormente serem eliminados do organismo (MARIONNET et al., 2006). Além de participarem em processos de detoxificação por formação de conjugados com a glutatona reduzida (GSH), as GSTs possuem papel no metabolismo de produtos secundários como na estabilização de flavonóides, atuando com peroxidases na redução de hidroperóxidos a monohidróxi-álcool no processo de estresse oxidativo (DIXON e LAPTHORN, 2002). A atividade desta enzima possui relação direta com o estresse oxidativo, já que utiliza a GSH como cofator e que também participa da degradação do  $H_2O_2$  através da enzima glutatona peroxidase (GPx), sendo um importante biomarcador (ROSSI, 2008).

A GPx é capaz de reduzir diversos tipos de peróxidos através da oxidação da GSH e é a principal peroxidase presente em peixes (VAN DER OOST et al., 2003). Ela é normalmente encontrada nas mitocôndrias e é utilizada para reduzir diversos tipos de peróxidos, inclusive hidroperóxidos levando-os aos seus correspondentes álcoois, empregando a GSH como cofator e gerando glutatona oxidada (GSSG) como produto (HAYES et al., 1997; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). A GPx tem sido utilizada como uma importante ferramenta de indicação de estresse oxidativo, uma vez que não somente atua na redução de peróxido de hidrogênio, como ocorre com a catalase (CAT), mas também a uma gama maior de peróxidos, ampliando a avaliação de exposição a poluentes ambientais (MOURENTE, 2002; VAN DER OOST et al., 2003).

Uma das principais enzimas antioxidantes é a superóxido dismutase (SOD), uma metaloenzima essencial ao sistema de defesa antioxidante, atuando como catalisadores da reação do  $O_2^-$  em  $O_2$  e  $H_2O_2$ . Pelo fato do  $O_2^-$  resultar em várias outras espécies altamente

reativas, o controle desse radical pela SOD constitui um importante mecanismo de defesa (TORRES et al., 2008). O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) resultante desse processo é posteriormente degradado pela CAT ou pela GPx. Em peixes, há diferenças na atividade da SOD de acordo com o tecido e com a espécie, sendo esta maior em peixes marinhos, quando comparados aos peixes de água doce, e em peixes herbívoros (WILHELM FILHO, 1996; LACKNER, 1998).

A glutathiona é um tripeptídeo ( $\gamma$ -glutamil-cisteinil-glicina) que desempenha função fundamental na proteção das células contra danos oxidativos causados, atuando como sequestradora de radicais; na homeostase tiólica; na manutenção do balanço redox da célula e para defesa contra agentes eletrofílicos, como os xenobióticos (MEISTER, 1988). Faz parte dos sistemas antioxidantes não enzimáticos, que reduz hidroperóxidos, e é responsável por sequestrar ERO e proteger membranas do estresse oxidativo (CHANG et al., 2003). Ela pode ser encontrada nas formas reduzida (GSH) ou oxidada (GSSG). Em quadros de estresse oxidativo muito intenso, a GSH pode ser perdida de modo irreversível, permanecendo na forma oxidada e não sendo novamente reduzida, podendo afetar diretamente a síntese de proteínas e DNA (LOMAESTRO e MALONE, 1995).

A lipoperoxidação (LPO) é um dos danos mais importantes causados pelas espécies reativas de oxigênio (ERO), sendo as membranas celulares os locais mais susceptíveis a essas reações de oxidação. A perda da integridade da membrana celular pode facilitar o ataque ao DNA, além de alterar o processo de transporte, a transdução de sinais mediada por receptores e o gradiente de íons e metabólitos (HIGUCHI, 2003). Durante a lipoperoxidação os grupos hidroperóxidos ligam-se aos sítios hidrofóbicos dos ácidos graxos insaturados, levando à perturbação nas interações lipídicas e, conseqüentemente, a alterações estruturais das biomembranas e lipoproteínas; e também,



à formação de radicais livres, que podem induzir a modificação secundária de outros constituintes da membrana (GIROTTI, 2002).

As proteínas podem ser modificadas por reações envolvendo espécies reativas de oxigênio. Entre essas reações, a carbonilação tem atraído grande atenção devido à sua natureza irreversível e irreparável. Quimicamente, a carbonilação oxidativa ocorre preferencialmente nos aminoácidos prolina, treonina, lisina e arginina, sendo um tipo de oxidação proteica que pode ser promovida por ERO, estando ligada a processos que formam cetonas e/ou aldeídos que reagem com o DNPH (2,4 dinitrofenilhidrazina), para formar hidrazonas detectáveis através de processos de espectrometria (WONG et al., 2008).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial tóxico, através de múltiplos biomarcadores, dos herbicidas atrazina e mesotriona de forma isolada e em mistura. Além disso, esclarecer se existem diferenças de sensibilidade a esses herbicidas entre duas espécies da família *Cichlidae*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Utilizar cinco concentrações distintas da atrazina, um composto reconhecidamente tóxico a muitas espécies de peixes, para realizar uma comparação entre as respostas obtidas através de biomarcadores genéticos (ensaio cometa em eritrócitos, fígado e brânquias) e bioquímicos (SOD, GST, GSH, GPx, LPO e PCO) em *O. niloticus* e *G. brasiliensis*, e determinar se existem diferenças entre elas quanto à sensibilidade a contaminação com esse herbicida.

- Determinar o potencial tóxico agudo da mesotriona, em 5 concentrações distintas, em *O. niloticus* e *G. brasiliensis* através do ensaio cometa em eritrócitos, fígado e brânquias; e resposta ao estresse oxidativo através de biomarcadores bioquímicos (SOD, GST, GSH, GPx, LPO e PCO);

- Avaliar através de biomarcadores genéticos (ensaio cometa em eritrócitos, fígado e brânquias) e bioquímicos (SOD, GST, GSH, GPx, LPO e PCO) em *O. niloticus* e *G. brasiliensis* se existe interação entre os xenobióticos em três tratamentos distintos: M 1 (concentração máxima, de cada contaminante, que não apresenta alterações significativas em macromoléculas em relação ao grupo controle), M 2 (concentração mais baixa, de cada contaminante, que apresenta alterações significativas em macromoléculas

em relação ao grupo controle ) e M 3 (mistura entre as maiores concentrações utilizadas de cada herbicida nos experimentos isolados). Caso exista, determinar se ocorre efeito sinérgico, antagonista ou aditivo;

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados e discussão estão apresentados na forma de capítulos, os quais correspondem a artigos científicos submetidos ou em fase de preparação. As referências bibliográficas estão reunidas no final desta tese.

### 3.1 CAPITULO I

## **COMPARAÇÃO DA RESPOSTA DE TOXICIDADE ENTRE UMA ESPÉCIE DE PEIXE NATIVA E UMA INTRODUZIDA EXPOSTAS À ATRAZINA**

L. D. S. Piancini<sup>a</sup>; I. C. Guiloski<sup>b</sup>; H. C. Silva de Assis<sup>b</sup>; M. M. Cestari<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Universidade Federal do Paraná, Departamento de Genética, Curitiba, Paraná, Brasil*

<sup>b</sup> *Universidade Federal do Paraná, Departamento de Farmacologia, Curitiba, Paraná, Brasil*

## RESUMO

Em anos recentes, cresceu o número de pesquisas utilizando peixes neotropicais na avaliação de substâncias potencialmente danosas, ou em estudos de monitoramento ambiental. Em contrapartida, peixes exóticos a região neotropical são mais comumente utilizados em trabalhos de toxicidade utilizando biomarcadores. O herbicida atrazina tem um amplo potencial de contaminação em diferentes compartimentos do ambientais e é um agente reconhecidamente danoso a saúde de diversas espécies de peixes. Apesar do crescente número de trabalhos com espécies neotropicais, atualmente não se sabe se há diferenças de resposta entre espécies introduzidas e nativas da região neotropical. Dessa forma, submetemos duas espécies de ciclídeos, *O. niloticus* (exótica) e *G. brasiliensis* (neotropical) a contaminação com atrazina em cinco diferentes concentrações. O ensaio cometa foi realizado em eritrócitos, brânquias e fígado. Esse último tecido também foi utilizado em análises bioquímicas de LPO, PCO, GST, GPx, SOD e GSH. A atrazina induziu estresse oxidativo e danos ao DNA nas duas espécies. No entanto, elas responderam de forma diferente ao xenobiótico. O *G. brasiliensis* apresentou níveis basais de estresse oxidativo e quebras ao DNA maiores do que *O. niloticus*. Apesar de *G. brasiliensis* parecer ser um organismo mais sensível a contaminação com a ATZ, *O. niloticus* se mostrou mais adequada para ser utilizada em bioensaios utilizando biomarcadores bioquímicos e de genotoxicidade.

## INTRODUÇÃO

Peixes servem como bioindicadores de poluição ambiental e podem ter um importante papel na avaliação de risco associada a contaminação do ambiente aquático, já que eles estão diretamente expostos aos agrotóxicos através do escoamento superficial pelas chuvas ou indiretamente pela cadeia alimentar (NWANI et al., 2010). Peixes são dotados de mecanismos de defesa para neutralizar o impacto de espécies reativas de oxigênio (ERO) resultante do metabolismo de vários químicos ou xenobióticos. O estresse oxidativo se desenvolve quando existe um desbalanço na taxa entre pro-oxidantes e antioxidantes, levando a geração de ERO. Contaminantes ambientais, como os herbicidas, metais pesados e inseticidas são conhecidos por modular o sistema defensivo antioxidante e causar danos a organismos aquáticos pela produção de ERO (GHISI et al., 2011; MELA et al., 2013a; MELA et al., 2013b). ERO, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e radical hidroxila ( $OH^\cdot$ ) em níveis acima do normal podem reagir com macromoléculas potencialmente levando a inativação de enzimas, peroxidação lipídica (LPO), danos ao DNA e até a morte celular (PEÑA-LLOPIS et al., 2003; BANUDEVI et al., 2006), porém em baixas concentrações seus efeitos são menos pronunciados. (NWANI et al., 2010)

Em anos recentes, cresceu o número de pesquisas utilizando peixes neotropicais na avaliação de substâncias potencialmente danosas, ou em estudos de monitoramento ambiental. Dentre essas espécies, destacam-se o *Rhamdia quelen* (GHISI et al., 2011; MELA et al., 2013a), *Prochilodus lineatus* (PAULINO et al., 2012a; PAULINO et al., 2012b; SANTOS e MARTINEZ, 2012; MORENO et al., 2014), *Hoplias malabaricus* (CESTARI et al., 2004; FERRARO et al., 2004; MELA et al., 2014), *Geophagus brasiliensis* (BENINCÁ et al., 2012; OSÓRIO et al., 2013; VOIGT et al., 2014) e diversas

espécies do gênero *Astyanax* (ERBE et al., 2010; ROSSI et al., 2011; AMORIM et al., 2013), entre outras.

Em contrapartida, peixes exóticos à região neotropical são mais comumente utilizados em trabalhos de toxicidade, como o *Salmo trutta* (BELPAEME et al., 1996; BOPP et al., 2008), *Danio rerio* (ZHU et al., 2011; BLAHOVÁ et al., 2013), *Cyprinus carpio* (GUSTAVINO et al., 2001; XING et al., 2010), *Oncorhynchus mykiss* (WAN et al., 2006; SALABERRIA et al., 2009) e *Oreochromis niloticus* (VENTURA et al., 2008; AMORIM et al., 2013). Em outros continentes, como a Ásia, também existe a preocupação em utilizar peixes nativos, como o caso de *Channa punctatus*, utilizado por Nwani et al., (2011, 2014).

Atrazina (ATZ) é um herbicida seletivo triazinico utilizado desde os anos 1950 em cultivos como o milho, cana-de-açúcar, soja, e outras culturas de folha larga (AZEVEDO et al. 2004). ATZ tem um amplo potencial de contaminação em diferentes compartimentos do meio ambiente por causa de suas características químicas como alto potencial de lixiviação e escoamento, alta persistência no solo, hidrólise lenta, baixa solubilidade em água e absorção moderada a matéria orgânica (BOLOGNESI, 2003). Estudos realizados nas duas últimas décadas mostraram que a ATZ é um dos herbicidas mais frequentemente detectados em rios e córregos, sendo que concentrações detectadas em águas de escoamento tem entre 0,2 a 20  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (SELIM, 2003), porém, em córregos adjacentes a áreas de cultivo, esse valor pode alcançar valores altíssimos como 1000  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (GRAYMORE et al. 2001).

ATZ foi banida na União Europeia em 2004, bem como todos os produtos que contenham esse princípio ativo. Essa restrição foi imposta principalmente porque a ATZ, bem como seus produtos de degradação, estava excedendo 0.1  $\mu\text{g.L}^{-1}$  em águas subterrâneas em muitas localidades, e com seu uso continuado poderia inviabilizar a



recuperação da qualidade dessas águas (UE, 2004). O conselho nacional do meio ambiente (CONAMA) limita a concentração máxima de ATZ em corpos d'água para preservação de espécies de água doce em  $2 \mu\text{g.L}^{-1}$  (BRASIL, 2005), mas mesmo essa concentração é tóxica para peixes (MELA et al. 2013a). Entretanto, concentrações muito maiores que essa são encontradas em águas superficiais de rios próximos a áreas cultivadas no Brasil (ARMAS et al., 2007).

Espécies reativas de oxigênio (ERO) são continuamente produzidas pelo metabolismo do  $\text{O}_2$ . Enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD) e a glutathione peroxidase (GPx) sequestram esses radicais livres prevenindo danos oxidativo. As reações de biotransformação envolvidas nas fases I e II de processos de metabolização de xenobióticos, que produzem compostos hidrofílicos essenciais para a eliminação de toxinas dos organismos, são uma fonte importante de ERO (STEGEMAN et al., 1992). Numerosos estudos tem demonstrado que a exposição a ATZ em peixes afeta a defesa por enzimas antioxidantes, causando um desbalanço entre a produção e a eliminação de ERO, resultando em stress oxidativo e danos aos tecidos (FATIMA et al., 2000; ELIA et al., 2002; GUL et al., 2004; JIN et al., 2010). A conjugação da glutathione S-transferase (GST) a ATZ para reduzir a glutathione (GSH) é a principal reação de fase II envolvida na detoxificação da ATZ em muitos organismos, incluindo os peixes (EGAAS et al., 1993; VAN DER OOST et al., 2003). GSH é essencial para o sistema de defesa desses organismos, já que a atividade de GPx e GST dependem de GSH como substrato. Essa molécula muda da forma reduzida (GSH) para a forma oxidada (GSSG) e é reciclada pela glutathione reductase. Mudanças nesse sistema de defesa são indicativos de detoxificação e biotransformação de xenobióticos em animais (VAN DER OOST et al., 2003) e são biomarcadores bioquímicos para o estresse oxidativo produzido pela ATZ (PAULINO; SOUZA; et al., 2012).

O estresse oxidativo está comumente associado a danos celulares, especialmente a macromoléculas como o DNA, lipídeos e proteínas. A oxidação do DNA é uma das formas mais comuns de causar quebras ao DNA (AZQUETA et al., 2009). A peroxidação lipídica (LPO) é um dos danos mais importantes causados pelas ERO, sendo as membranas celulares os locais mais susceptíveis a essas reações de oxidação. A principal modificação proteica originada pelo acréscimo de ERO relaciona-se diretamente à oxidação de aminoácidos contendo um grupo tiol, como as cisteínas. Muitos testes são conhecidos para quantificar os danos a essas moléculas, como por exemplo o ensaio cometa para o DNA, a peroxidação lipídica (LPO) para membranas, e a carbonilação proteica (PCO) para as proteínas. Esses testes tem valores altamente preditivos como biomarcadores de efeitos (LIVINGSTONE, 2003; FERREIRA et al. 2005; FILIPAK NETO et al. 2007; OSÓRIO et al. 2013).

Muitas características comuns a *Geophagus brasiliensis* e *Oreochromis niloticus*, como grande distribuição ambiental, disponibilidade de aquisição ou captura no ano todo, fácil aclimatação a condições laboratoriais e importância comercial, fazem dessas espécies potenciais bioindicadores para estudos de toxicidade. Dessa forma, o presente trabalho busca fazer comparações de respostas toxicológicas e genotoxicológicas entre essas duas espécies submetidas a contaminação hídrica com ATZ, utilizando nove diferentes biomarcadores.

## MATERIAL E MÉTODOS

A atrazina (ATZ, CAS n° 1912-24-9, pureza 98.8%, Sigma-Aldrich) foi diluída em água destilada, a 22 °C, em uma concentração de 0,022 g.L<sup>-1</sup>. A partir dessa solução mãe as diluições foram feitas nos aquários nas concentrações de 1,5; 6,25; 25; 100 e 400 µg.L<sup>-1</sup>. Segundo Ventura et al. (2008), 25 µg.L<sup>-1</sup> é a concentração aplicada em culturas de milho. Os demais grupos testes foram calculados na grandeza de 4 para cima ou para baixo de 25 µg.L<sup>-1</sup>. A menor concentração, 1,5 µg.L<sup>-1</sup>, é bem próxima à concentração máxima de agrotóxicos permitida pela legislação brasileira (2 µg.L<sup>-1</sup>) para águas com o intuito de preservação da vida aquática (BRASIL, 2005).

### *Desenho experimental*

Os espécimes de *Oreochromis niloticus* (tilápia) e *Geophagus brasiliensis* (acará) foram adquiridos de uma piscicultura localizada na região de Toledo-PR. Os peixes foram aclimatados por 60 dias em tanques de 250 L de água filtrada com aeração constante, temperatura média de 22 °C e alimentados diariamente. Duas semanas antes de iniciar a exposição a ATZ, 105 peixes foram transferidos para 7 aquários (15 peixes por aquário) de 108 L com condições similares aos tanques. Um aquário foi destinado ao grupo controle negativo (CN) com água filtrada, um ao grupo controle positivo (MMS) e os outros 5 as concentrações de 1,5; 6,25; 25; 100 e 400 µg.L<sup>-1</sup>.

Os peixes foram submetidos a contaminação hídrica com ATZ em sistema estático por um período de 96 horas, e os peixes pertencentes ao grupo controle positivo foram expostos por 24 horas ao metil metano sulfonato por injeção intraperitoneal na concentração de 0,5 mg.kg<sup>-1</sup>. Após esse período os espécimes foram anestesiados com benzocaína 10% e tiveram uma amostra de sangue coletada por punção da artéria caudal e após o sacrifício, por secção medular, tiveram seu fígado e brânquias retirados para as

análises. O fígado foi retirado inteiro e colocado em uma placa de petri contendo PBS. Uma pequena amostra do órgão foi separada com o auxílio de um bisturi e colocado em um microtubo contendo 500 µL de soro bovino fetal (SBF), a outra parte foi colocada em um microtubo e armazenada a -80 °C para a realização das análises bioquímicas. Foi retirado o terceiro arco branquial do lado esquerdo de cada peixe, esse arco foi então colocado em uma placa de petri e lavado com tampão fosfato (PBS, pH 7,4). O arco ósseo foi removido e apenas as lamelas foram transferidas para um microtubo contendo 500 µL de SBF.

#### *Ensaio Cometa*

O ensaio cometa com eritrócitos (ECE) foi realizado de acordo com Speit e Hartmann (1999), com modificações segundo Ferraro et al. (2004) e Cestari et al. (2004). Para o ensaio cometa com brânquias (ECB) e fígado (ECF), as amostras foram mecanicamente homogeneizadas (homogenizer Tecnal – TE-103) a 1.500 RPM (RAMSDORF et al., 2009). 20 µL da suspensão celular foram retirados de cada amostra e misturados com 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão (Invitrogen, 0.5%). Os passos seguintes foram realizados de acordo com Speit e Hartmann (1999).

De cada peixe, 100 nucleóides de cada tecido foram analisados de acordo com a classificação visual baseada na migração dos fragmentos de DNA a partir do núcleo. Os resultados foram categorizados em classes de 0 (sem dano) a 4 (dano máximo) (COLLINS et al., 1997).

#### *Análises Bioquímicas*

As amostras de fígado foram descongeladas em gelo e pesadas, sendo homogeneizadas na proporção 1:10 (m/V) em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 com auxílio

de micro-homogeneizador. O homogeneizado foi centrifugado por 30 minutos a 15.000 x g a 4°C, obtendo-se assim o sobrenadante, do qual foram retiradas alíquotas para cada uma das análises. Atividade da GST foi mensurada a 340 nm (KEEN et al., 1976). A atividade da SOD foi mensurada a 440 nm de acordo com Gao et al. (1998). A atividade da GPx foi mensurada a 340 nm de acordo com Paglia e Valentine (1976). A concentração de GSH foi obtida de acordo com Sedlak e Lindsay (1968), mensurada a 415 nm. A análise da lipoperoxidação (LPO) foi realizada através da avaliação da concentração de hidroperóxidos de acordo com o proposto por Jiang et al. (1992). O conteúdo de proteínas carboniladas (PCO) foi determinada pelo método de Levine et al. (1994).

#### *Análise Estatísticas*

Os escores obtidos como resultados através do ensaio cometa é calculado através de classes arbitrárias na análise visual, por esse motivo utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para se verificar se havia diferença entre os entre os grupo, com pós teste de Student-Newman-Kleus, com nível de significância de 0,05.

Os dados obtidos através das análises bioquímicas de GST, SOD, GPx, GSH, LPO e PCO tiveram a normalidade testada pelo teste de Kolmogorov–Smirnov. Quando os dados obedeceram aos critérios de normalidade utilizou-se ANOVA de uma via, seguida do pós teste de Tukey, com nível de significância de 0,05. Quando os dados não obedeceram aos critérios de normalidade utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com pós teste de Student-Newman-Kleus, com nível de significância de 0,05.

Para comparar as respostas dos biomarcadores entre as espécies foi utilizado ANOVA de uma via ou Mann Whitney, quando os dados não obedeciam aos critérios da normalidade. Foi feita comparação grupo a grupo para ver se havia diferença entre as espécies. Como cada espécie possui fisiologia diferente e nível basal de concentração de

enzimas, danos ao DNA, lipídios ou proteínas, inerentes à espécie, foi calculado a diferença entre a resposta de cada indivíduo e a média aritmética do grupo controle para cada biomarcador. Por exemplo, para se calcular a diferença do indivíduo 1 quanto à lipoperoxidação no grupo exposto a 1,5  $\mu\text{g.L}^{-1}$ :

$$\Delta 1 = \text{LPO}_{1,5} - \bar{X} \text{LPO}_{\text{CN}}$$

Onde:

$\Delta 1$ : diferença entre média e indivíduo 1;

$\text{LPO}_{1,5}$ : valor da concentração de hidroperóxidos no indivíduo 1 exposto a 1,5  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de ATZ

$\bar{X} \text{LPO}_{\text{CN}}$ : média da concentração de hidroperóxidos no grupo controle negativo.

## RESULTADOS

### *Oreochromis niloticus*

Através do ensaio cometa, pudemos observar aumento de dano ao DNA de eritrócitos em relação ao grupo controle apenas na maior concentração (fig. 1A). Nos hepatócitos (fig. 1B) observamos aumento de danos ao DNA nas concentrações de 25, 100 e 400  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ; e nas brânquias (fig. 1C) nas concentrações de 1,5; 25; 100 e 400  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .

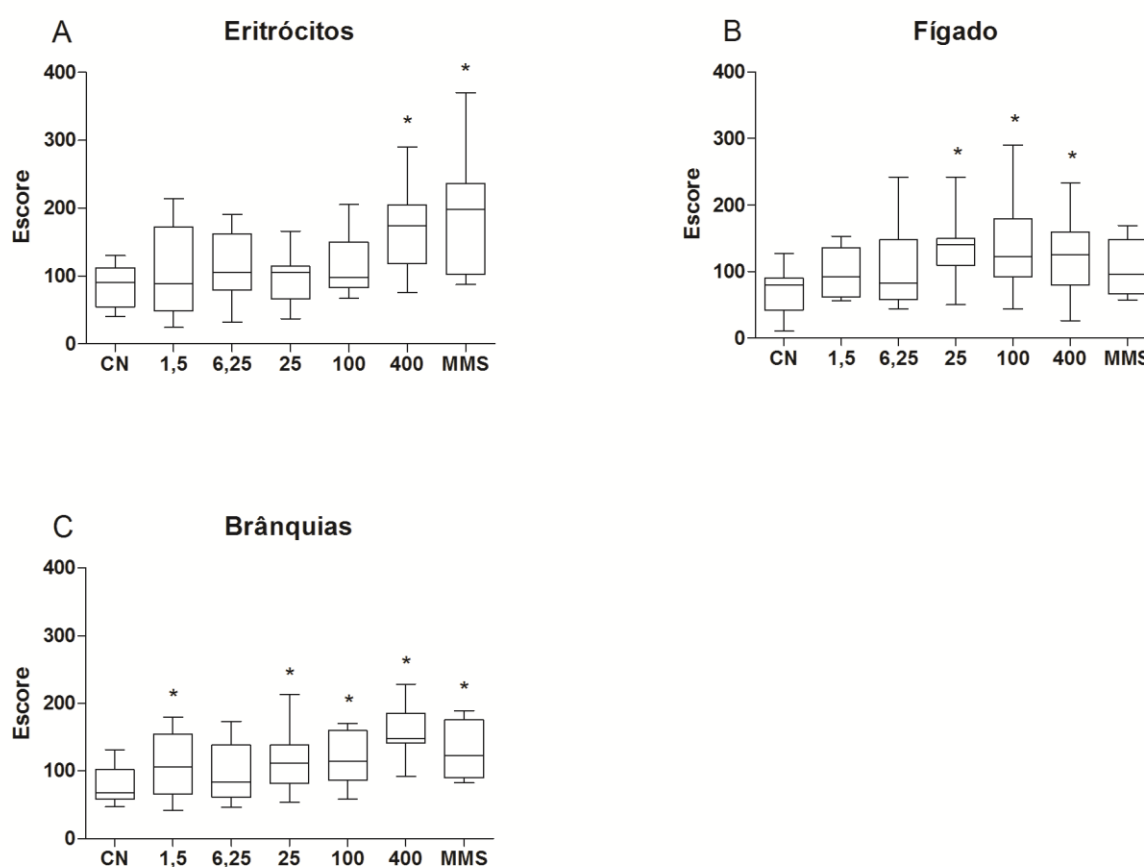


Figura 1: Escores do ensaio cometa de (A) eritrócitos, (B) fígado e (C) brânquias de *O. niloticus* expostas à ATZ. \* representa diferença estatística entre tratamento e CN, com  $p < 0,05$ .

A atividade da GST diminuiu no grupo 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (fig. 2A) enquanto que a de SOD aumentou nos grupos expostos a 25 e 400  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de ATZ (fig.2B). GPx não teve alteração significativa em sua atividade (fig. 2C). A concentração de GSH diminuiu em todos os tratamentos em relação ao CN (fig. 2D). Indivíduos expostos a 1,5 e 6,25  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de ATZ apresentaram concentrações maiores de peróxidos lipídicos que os peixes do grupo controle (fig. 2E), no entanto, não ocorreu diferença na concentração de proteínas carboniladas (fig. 2F).

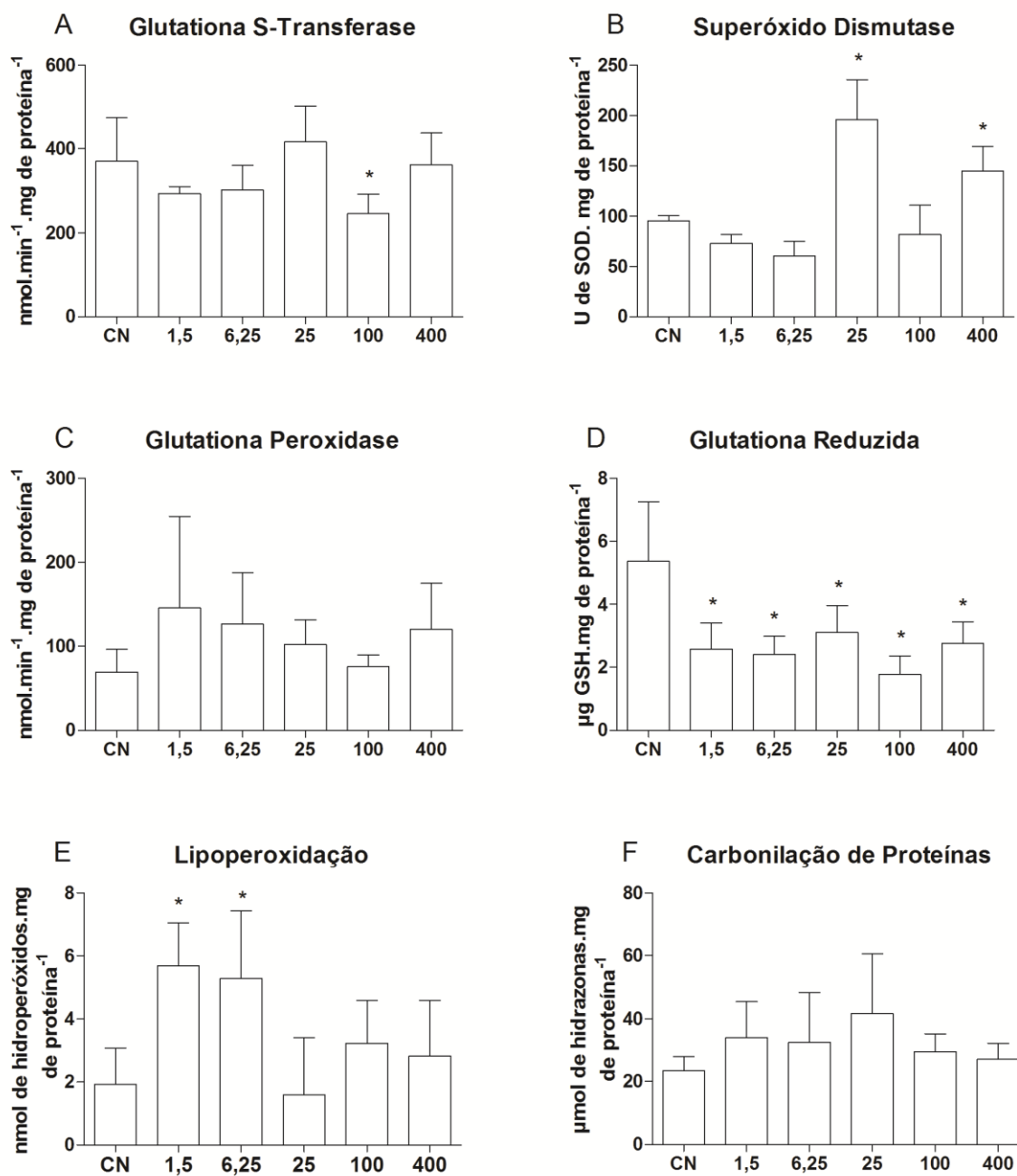


Figura 2: Análises bioquímicas em *O. niloticus* expostas à atrazina. (A) GST, (B) SOD, (C) GPx, (D) GSH, (E) LPO e (F) PCO. \* representa diferença estatística entre tratamento e CN, com  $p < 0,05$ .



## *Geophagus brasiliensis*

Observamos aumento dos danos ao DNA de eritrócitos nos peixes submetidos as duas maiores concentrações da ATZ (figura 3A). Em hepatócitos (figura 3B) e células branquiais (figura 3C) ocorreu diferença significativa entre o grupo controle e os animais expostos as concentrações superiores a 25  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .

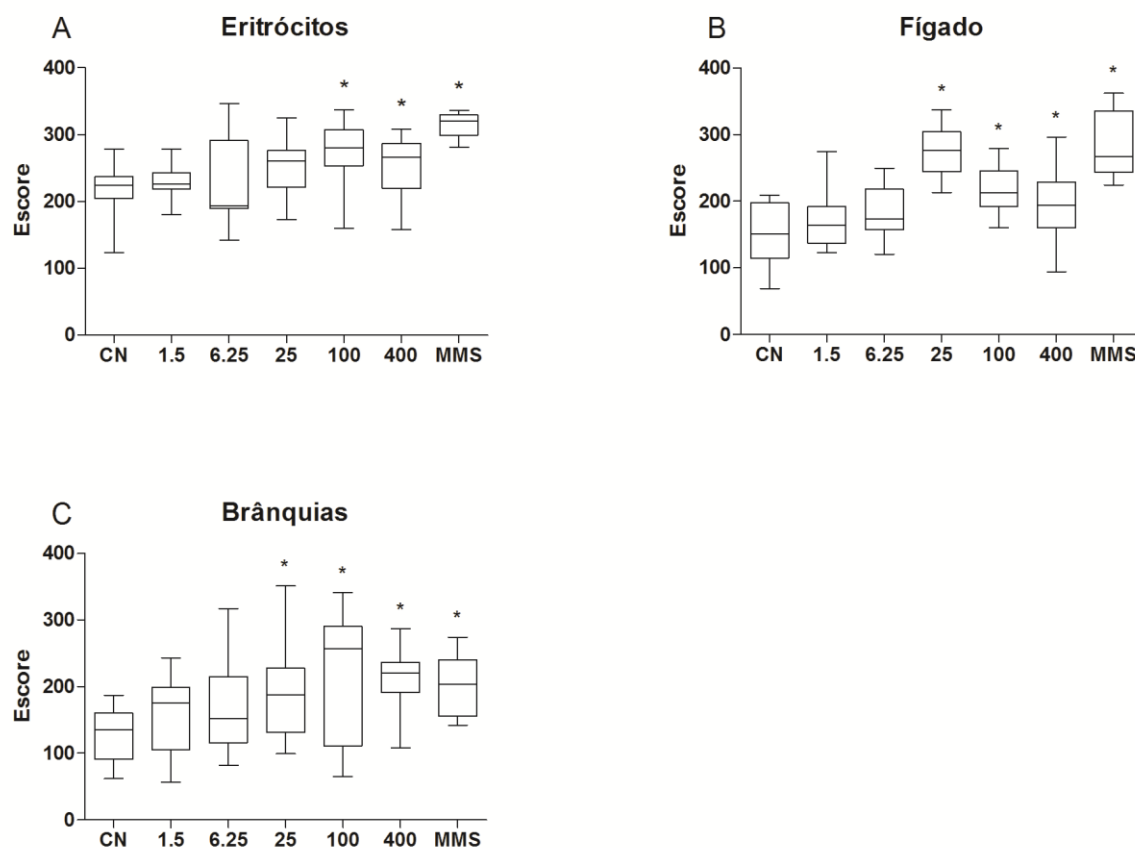


Figura 3: Escores do ensaio cometa de (A) eritrócitos, (B) fígado e (C) brânquias de *G. brasiliensis* expostas à ATZ. \* representa diferença estatística entre tratamento e CN, com  $p < 0,05$ .

A atividade de GST não diferiu entre os grupo (fig. 4A), no entanto a SOD aumentou sua atividade no grupo 25  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (fig. 4B) e a GPx nos grupos expostos a 100 e 400  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de ATZ (fig. 4C). Não ocorreu diferença entre controle e nenhum dos tratamentos na concentração GSH (fig. 4D), LPO (fig. 4E) e de proteínas carboniladas (fig. 3F).

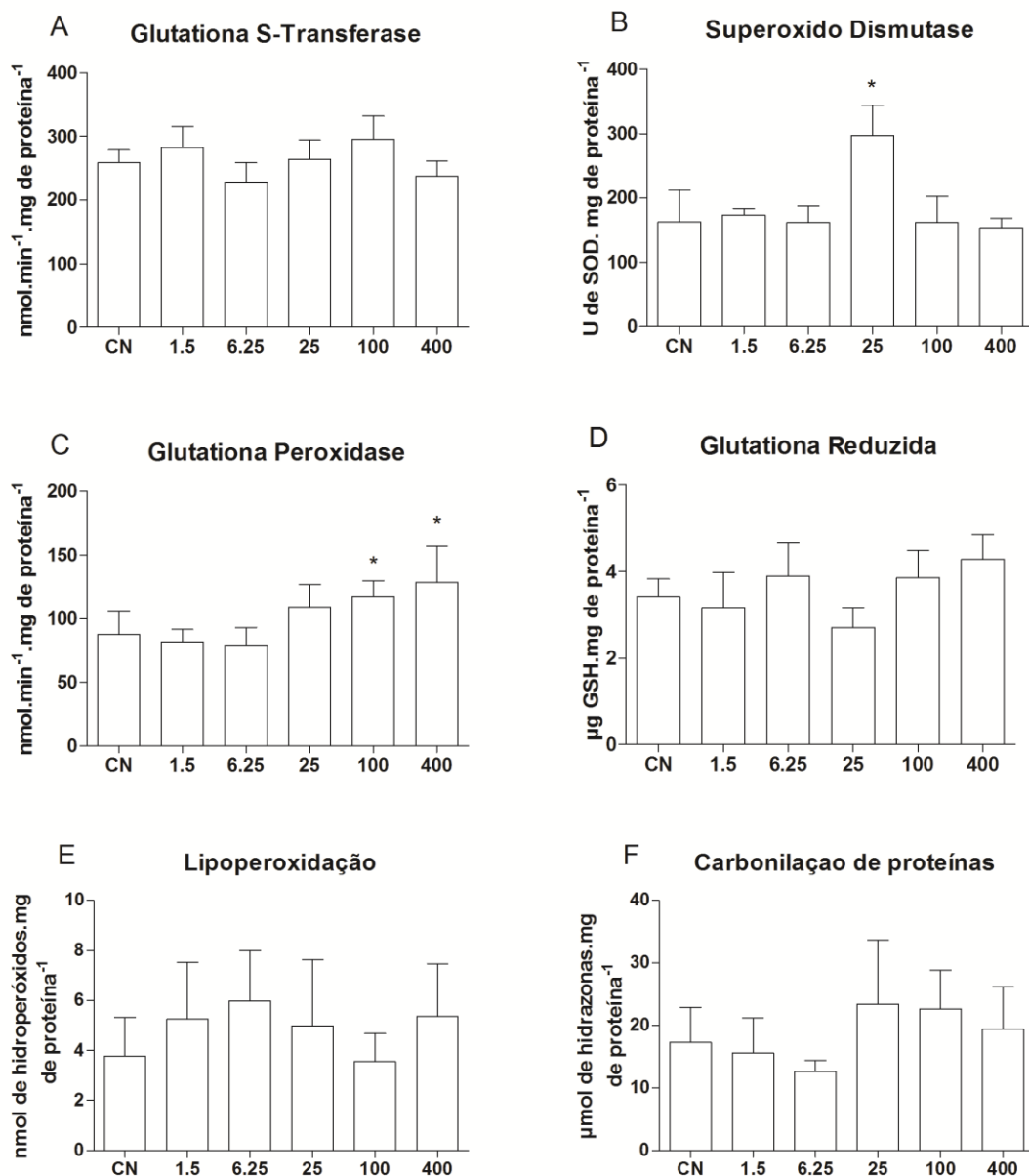


Figura 4: Análises bioquímicas em *G.brasiliensis* expostos à atrazina. (A) GST, (B) SOD. (C) GPx, (D) GSH, (E) LPO e (F) PCO. \* representa diferença estatística entre tratamento e CN le, com  $p < 0,05$ .

## Comparativo entre espécies

Uma visão geral das diferenças entre as respostas dos biomarcadores testados nas duas espécies pode ser visualizada na Tabela 01.

Quando comparados os grupos controle, as duas espécies apresentaram o mesmo nível basal de atividade da GPx. Os *G. brasiliensis* do grupo controle apresentaram danos ao DNA mais acentuados em todos os tecidos testados e também apresentaram maior concentração de LPO e atividade da SOD ao comparar com *O. niloticus*. Já *O. niloticus* apresentaram maior atividade de GST, bem como maior concentração de GSH e PCO em relação aos *G. brasiliensis*.

Nos grupos expostos a  $1,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ , *O. niloticus* apresentaram concentração maior de PCO e LPO em relação à *G. brasiliensis*, e estes tiveram maior atividade de GST, SOD e GSH do que *O. niloticus*.

Nos grupos expostos a  $6,5 \mu\text{g.L}^{-1}$  de ATZ, *O. niloticus* apresentaram atividade de GPx e concentração de PCO aumentadas, e a atividade de SOD e quantidade de GSH diminuídas quando comparados a *G. brasiliensis*.

Na concentração de  $25 \mu\text{g.L}^{-1}$  de ATZ, os danos ao DNA de eritrócitos e hepatócitos, bem como a concentração de GSH foi maior em *G. brasiliensis*, já a atividade de GPx é menor nessa espécie em comparação a *O. niloticus*.

Nos grupos expostos a  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$  de ATZ, *O. niloticus* tiveram maior concentração de lipoperóxidos, porém apresentaram menores escores no ECE, menor concentração de GSH e atividade de GST em relação à *G. brasiliensis*.

Nas maiores concentrações testadas do xenobióticos, *O. niloticus* teve mais danos no ECE e maior atividade de SOD, porém menores concentração de GSH em relação a *G. brasiliensis*.

TABELA 1 – Diferenças de respostas entre as espécies frente a exposição com atrazina.

		Controle	1,5 µg.L <sup>-1</sup>	6,25 µg.L <sup>-1</sup>	25 µg.L <sup>-1</sup>	100 µg.L <sup>-1</sup>	400 µg.L <sup>-1</sup>
ECE	<i>O. niloticus</i>	-	=	=	-	-	+
	<i>G. brasiliensis</i>	+			+	+	-
ECF	<i>O. niloticus</i>	-	=	=	-	=	=
	<i>G. brasiliensis</i>	+			+		
ECB	<i>O. niloticus</i>	-	=	=	=	=	=
	<i>G. brasiliensis</i>	+					
GST	<i>O. niloticus</i>	+	-	=	=	-	=
	<i>G. brasiliensis</i>	-	+			+	
SOD	<i>O. niloticus</i>	-	-	-	=	=	+
	<i>G. brasiliensis</i>	+	+	+			-
GPx	<i>O. niloticus</i>	=	=	+	+	-	=
	<i>G. brasiliensis</i>			-	-	+	
GSH	<i>O. niloticus</i>	+	-	-	-	-	-
	<i>G. brasiliensis</i>	-	+	+	+	+	+
LPO	<i>O. niloticus</i>	-	+	=	=	+	=
	<i>G. brasiliensis</i>	+	-			-	
PCO	<i>O. niloticus</i>	+	+	+	=	=	=
	<i>G. brasiliensis</i>	-	-	-			

(+) representa diferença estatística entre as espécies para o biomarcador, sendo que esta tem maiores valores em relação a outra;

(-) representa diferença estatística entre as espécies para o biomarcador, sendo que esta tem menores valores em relação a outra;

(=) as espécies não apresentam diferença estatística na resposta do biomarcador.

## DISCUSSÃO

De modo geral, os escores observados no ensaio cometa de todos os tecidos é superior em *G. brasiliensis* com relação à *O. niloticus*, mesmo quando se comparam os grupos controle. Esse padrão também é observado para a SOD e LPO. Levando em conta que o próprio metabolismo celular promove geração de ERO, nossos dados mostram que provavelmente, o *G. brasiliensis* tem maior produção de radicais livres em seu metabolismo, gerando danos naturais mais acentuados ao organismo.

Nos peixes as brânquias, rins e intestinos desempenham um importante papel na biotransformação e excreção de xenobióticos, embora o fígado seja o principal órgão onde esses processos ocorrem (VAN DER OOST et al., 2003) A metabolização da atrazina provavelmente se inicia na fase II do metabolismo de xenobióticos pela GST, visto que em plantas e animais, este herbicida se conjuga facilmente a GSH e, portanto, a fase I tem pouco impacto sobre a eliminação desse composto (WIEGAND et al., 2001). Essa enzima tem comportamento distinto entre as espécies testadas em nosso trabalho. Sua atividade é diferente entre os grupos controles, sendo que a maior atividade é encontrada em *O. niloticus*. No entanto, nos grupos tratados com atrazina, a GST tem atividade menor em *O. niloticus* em relação ao acará nos tratamentos com 1,5 e 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , sendo que nessa última concentração, a atividade de GST é inibida significativamente em *O. niloticus* em relação ao CN. A diferença entre as espécies nesses dois grupos não se deve a um aumento da atividade em *G. brasiliensis*, mas sim a uma inibição na outra espécie, pequena no grupo 1,5  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , mas significativa no grupo 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Esta redução na atividade da GST em *O. niloticus* pode ser consequência dos baixos níveis de GSH, uma vez que ela é o principal substrato para a ação da GST na metabolização da ATZ, e ambos se apresentaram diminuídos, provavelmente devido à grande demanda de conjugação do herbicida com a GSH (WIEGAND et al., 2001).

A biotransformação da ATZ em compostos hidrofílicos para facilitar sua excreção é de extrema importância. Esse herbicida, é dificilmente é bioacumulado devido sua fácil metabolização (SOLOMON et al., 2008). No entanto, em ambas as espécies, pode estar ocorrendo o oposto, uma vez que a ATZ poderia exaurir as possíveis vias para sua detoxificação e, conseqüentemente, o herbicida estaria permanecendo dentro do hepatócito. Tal afirmação pode ser corroborada pelos resultados do ensaio do cometa em hepatócitos, no qual foi observado aumento significativo nos danos do DNA das duas espécies expostas as concentrações de 25, 100 e 400  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de ATZ. Além disso, a redução na atividade da GST em *O. niloticus* expostas a 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de ATZ corrobora essa hipótese. Tal fenômeno acontece também em *P. lineatus* expostos a concentrações de 2 e 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de atrazina por 48 horas (SANTOS e MARTINEZ, 2012).

A ATZ se conjuga facilmente a GSH (WIEGAND et al., 2001), e por essa razão não termos observado redução dessa enzima em *G. brasiliensis* tenha sido um resultado não esperado. A concentração de GSH era maior no grupo controle em *O. niloticus* em relação a *G. brasiliensis*. Em todos os tratamentos houve redução significativa de GSH nas em *O. niloticus*, mas não em *G. brasiliensis*. Quando comparadas as espécies, a concentração era maior em *G. brasiliensis* em todos os grupos expostos a ATZ. Aparentemente o herbicida se conjugou a GSH em *O. niloticus*, mas não em *G. brasiliensis*. Redução nos níveis de GSH após exposição a atrazina foi observada em fígado e ovários de *Danio rerio* (JIN et al., 2010), fígado de *Rhamdia quelen* (MELA et al., 2013a), bem como em *Prochilodus lineatus* após 48 h de exposição (SANTOS e MARTINEZ, 2012). No entanto, em brânquias dessa mesma espécie Paulino et al. (2012b) não observaram alterações nos níveis de GSH em peixes expostos ao herbicida por 48 horas e 14 dias. Já Xing et al. (2015) observaram aumento da GSH em hepatócitos

de carpas expostas a 4,28 e 42,8  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de ATZ, porém redução no grupo exposto a 428  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .

O esgotamento do conteúdo celular de GSH abaixo de níveis críticos impede a conjugação de xenobióticos, como ATZ, a GSH permitindo que estes se combinem com outras macromoléculas (YAMANO, 1995). No entanto, os organismos são equipados com enzimas interdependentes que atuam para aliviar o estresse oxidativo e reparar macromoléculas danificadas. SOD e CAT são as principais enzimas na eliminação de ERO formado durante a bioativação dos xenobióticos no tecido hepático e a indução do sistema SOD/CAT fornece a primeira linha de defesa contra ERO. SOD faz a ligação do radical  $\text{O}_2$  ao peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (SK e BHATTACHARYA, 2006). A atividade dessa enzima foi maior em *G. brasiliensis* em relação a *O. niloticus* nos grupos controle, 1,5 e 6,25  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . No entanto, no grupo 25  $\mu\text{g.L}^{-1}$  em ambas as espécies sua atividade aumenta significativamente em relação aos grupos controles, sendo que não difere entre as espécies. No grupo 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$  também não há diferença entre as espécies quanto a atividade dessa enzima, porém a atividade não é significativamente superior aos controles. Já no tratamento 400  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , a atividade aumenta significativamente em *O. niloticus*, mas não no acará. SOD parece desempenhar um papel importante em resposta a contaminação com ATZ. Jin et al. (2010) observaram que a ATZ nas concentrações de 100 e 1000  $\mu\text{g.L}^{-1}$  induziu um aumento da atividade de SOD e CAT em fígado de *D. rerio*. Resultados similares foram reportados para outras espécies. Por exemplo, Qian et al. (2008) reportaram que a ATZ nas concentrações de 50 a 400  $\mu\text{g.L}^{-1}$  induziram um aumento significativo dose dependente na atividade de SOD e CAT em *Chlorella sp.* (JIN et al., 2010). Paulino et al. (2012b) observaram aumento na atividade de GST, SOD e CAT em brânquias de *P. lineatus* após exposição crônica a 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , no entanto isso não preveniu o aumento nos níveis de LPO.

A enzima antioxidante GPx catalisa a redução do peróxido de hidrogênio, mas com gasto de GSH (LIU et al., 2008). Entre os grupos controles das duas espécies, esse foi o único biomarcador que apresentava resposta similar. *O. niloticus* apresentaram um acréscimo na atividade dessa enzima em relação a *G. brasiliensis* nos grupos 6,5 e 25  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . No entanto, essa última espécie apresenta indução significativa de GPx em relação ao controle nos tratamentos 100 e 400  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Essa maior concentração de ATZ provavelmente também induziu aumento na atividade de GPx não significativo em relação ao controle em *O. niloticus*, pois não existe diferença de resposta entre as duas espécies. A falta de ativação da GPx em *O. niloticus* pode ser um mecanismo para preservar o conteúdo de GSH na célula depois de um nível crítico, favorecendo a conjugação da ATZ a GSH pela GST (VAN DER OOST et al., 2003). Em *G. brasiliensis*, onde não vemos diminuição da concentração de GSH, notamos aumento significativo da atividade de GPx nos tratamentos 100 e 400  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , mostrando que as ERO produzido pela ATZ também pode ser combatido por essa enzima quando não há decaimento na concentração de GSH. Em uma espécie de bagre neotropical, o *Rhamdia quelen*, MELA et al. (2013) observaram redução da concentração de GSH acompanhada de redução da atividade de GPx em concentrações de 2, 10 e 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . No entanto, BLAHOVÁ et al. (2013) observou aumento na atividade da glutathione peroxidase, bem como da SOD em *Danio rerio* expostos a 30  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de ATZ, além de aumento significativo de LPO e atividade da glutathione reductase (GR), responsável pela redução da glutathione oxidada (GSSG) e manutenção dos níveis normais de GSH (SANTOS e MARTINEZ, 2012).

A consequência final do estresse oxidativo é a geração de danos a macromoléculas como o DNA, lipídios ou proteínas. *G. brasiliensis* apresentaram níveis basais de danos ao DNA e a membranas lipídicas maiores no grupo controle, porém menor dano a proteínas. Nos dois menores tratamentos com ATZ, as concentrações de proteínas



carboniladas também são menores em *O. niloticus*, porém nos tratamentos acima de 25 essa diferença não foi observada. MELA et al. (2013a) não encontraram aumento significativo de PCO em *R. quelen* expostos a ATZ.

A LPO aumenta significativamente nos tratamentos 1,5 e 6,25  $\mu\text{g.L}^{-1}$  em *O. niloticus*, porém, esse aumento no grupo 6,5  $\mu\text{g.L}^{-1}$  não reflete em uma diferença entre as espécies. Nas demais concentrações de ATZ, para as duas espécies, não foi observado aumento da LPO, e pelo menos uma enzima de resposta ao estresse oxidativo estava aumentada significativamente em relação ao controle, com exceção do grupo 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$  em *O. niloticus*. Nesse mesmo tratamento observamos mais LPO em *O. niloticus* em relação à *G. brasiliensis*. Aparentemente as enzimas envolvidas no processo de eliminação de ERO parecem estar sendo eficientes nesses tratamentos, não levando a formação de peróxidos lipídicos. Esse resultado se contrapõe a dados encontrado na literatura. Alguns trabalhos encontraram aumento na atividade de enzimas como a SOD, GPx e GST, no entanto, o aumento da atividade dessas enzimas não refletiu em menores danos a membranas lipídicas em *D. rerio* (JIN et al., 2010; BLAHOVÁ et al., 2013), e em *P. lineatus* (PAULINO et al., 2012b) expostos a ATZ.

Herbicidas triazínicos, incluindo a atrazina, são capazes de se ligarem diretamente ao DNA, através de mecanismos de intercalação e formação de aductos entre as bases adenina e guanina (OLIVEIRA-BRETT E SILVA, 2002). O ensaio cometa revelou aumento significativo de quebras ao DNA em fígado e brânquias na concentração de 25  $\mu\text{g.L}^{-1}$  para as duas espécies, e eritrócitos nos tratamentos 100 e 400  $\mu\text{g.L}^{-1}$  em *G. brasiliensis* e apenas em 400  $\mu\text{g.L}^{-1}$  nos eritrócitos de *O. niloticus*. Quando comparadas as espécies, danos a fígado e sangue foram maiores em *G. brasiliensis* do que em *O. niloticus* expostos a concentração de 25  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Essa espécie também apresentou danos mais acentuados que a outra em eritrócitos no tratamento 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . No entanto na

concentração 400  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , *O. niloticus* tiveram danos significativamente superiores ao acará. A menor concentração teste causou aumento de danos ao DNA de células branquiais de tilápia, no entanto, quando se compara as espécies, não existe diferença entre seus escores para esse grupo. A LPO pode ser utilizada como um marcador de estresse oxidativo. Aumento de danos ao DNA acompanhado de aumento de LPO foi observado apenas nas brânquias de *O. niloticus* submetidas a menor concentração de ATZ. Como discutido anteriormente, nos outros tratamentos onde havia alguma enzima de resposta a ERO ativa, não observamos aumento de LPO, no entanto observamos danos ao DNA nas duas espécies. Esses dados indicam que os danos ao DNA observados nos três diferentes tecidos testados não estão ligados a presença de ERO nas células. (SANTOS e MARTINEZ, 2012) obtiveram resultados similares na espécie *P. lineatus*, onde ocorreu danos ao matéria genético nos mesmos tecidos analisados em nosso trabalho. A atrazina tem seu potencial genotóxico demonstrado em vários tecidos de diversas espécies de peixes (VENTURA et al., 2008; PIANCINI, 2011; NWANI et al., 2011; CAVAS, 2011; SANTOS e MARTINEZ, 2012) e, neste caso, também está causando danos ao DNA de eritrócitos, células branquiais e hepatócitos das duas espécies de ciclídeos analisadas.

## CONCLUSÕES

A ATZ induziu estresse oxidativo e danos ao material genético nas duas espécies de peixes testadas. No entanto, elas responderam de forma diferente ao xenobiótico. O *G. brasiliensis* apresentou níveis basais de estresse oxidativo e quebras ao DNA maiores do que *O. niloticus*, o que provavelmente é a causa de não termos observado variações nos biomarcadores nessa espécie nas concentrações mais baixas de ATZ. Mesmo assim, *G. brasiliensis* parecem sofrer danos mais severos ao material genético causados pela atrazina nas concentrações de 25 e 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .

O modo de combater ERO gerado pela ATZ foi diferente entre as espécies, enquanto que em *O. niloticus* a GSH teve um grande decréscimo em todos os tratamentos, provavelmente devido a ligação com a ATZ, a SOD (aumentada nos grupos 25 e 400  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) parece ser a principal enzima envolvida na eliminação de radicais livres. Em *G. brasiliensis*, onde não ocorre redução da GSH, a GPx também está envolvida no processo de eliminação de ERO, notadamente nos dois tratamentos com as maiores concentrações do xenobiótico.

*O. niloticus* se mostrou mais adequada para ser utilizada em bioensaios utilizando biomarcadores bioquímicos e de genotoxicidade, pois nessa espécie é possível constatar as alterações causadas pelo xenobióticos em concentrações mais baixas, permitindo uma análise mais detalhada de causa-efeito da exposição.

## 3.2 CAPÍTULO II

### **HERBICIDA MESOTRIONA PROMOVE ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E DANOS AO DNA EM DUAS ESPÉCIES DE PEIXES**

L. D. S. Piacini<sup>a</sup>; I. C. Guiloski<sup>b</sup>; H. C. Silva de Assis<sup>b</sup>; M. M. Cestari<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Universidade Federal do Paraná, Departamento de Genética, Curitiba, Paraná, Brasil*

<sup>b</sup> *Universidade Federal do Paraná, Departamento de Farmacologia, Curitiba, Paraná, Brasil*

## RESUMO

O uso de pesticidas e herbicidas se tornou parte integrante dos sistemas agrícolas modernos. É fato que o escoamento pela água de chuvas e sistemas de irrigação são a fonte majoritária de contaminantes agrícolas para o ambiente aquático, subsequentemente deteriorando a qualidade da água. Alterações na composição química natural desses ambientes aquáticos podem afetar a fauna aquática, particularmente os peixes. Muitos desses compostos, ou seus metabólitos, tem efeitos tóxicos relacionados ao estresse oxidativo e a danos ao DNA. A mesotriona está entre os novos herbicidas que surgiram como alternativa após o banimento da atrazina na Europa. Desde então nenhum trabalho utilizando biomarcadores foi realizado em qualquer espécie de peixes testando a toxicidade desse composto. Objetivo do nosso trabalho foi testar o potencial de geração de estresse oxidativo e danos ao DNA em duas espécies de ciclídeos expostas a mesotriona em cinco concentrações. O xenobiótico foi genotóxico em concentrações muito inferiores a concentrações de aplicação em campo ( $200 \text{ L}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) para as duas espécies. A quantidade de GSH aumentou, bem como a atividade da GPx em *O. niloticus*, e a GST e SOD em *G. brasiliensis*. A mesotriona também foi capaz de causar danos oxidativos à lipídeos, mas não a proteínas nos ciclídeos testados. Apesar de não parecer danosa na possível concentração encontrada na natureza, nossos resultados mostram que deve-se ter cautela no uso desse herbicida, pois em concentrações baixas ele foi capaz de induzir genotoxicidade e geração de estresse oxidativo em peixes.

## INTRODUÇÃO

Herbicidas são agentes utilizados para destruir plantas daninhas e datam de antes de Cristo, quando os Romanos utilizavam lixo orgânico para manter as estradas. A partir de 1.800 d.C. intensificou-se o uso de herbicidas inorgânicos como sulfato de cobre, sulfato de amônio, arsenito de sódio e clorato de potássio na agricultura, pois com o cultivo de plantas de uma mesma espécie, teve início, também, o desenvolvimento de pestes e pragas na agricultura. Somente em 1935 foi produzido o primeiro herbicida orgânico, DNOC (2-metil-3,5-dinitrofenol), e a partir da década de 40 seguiu-se uma crescente produção e diversificação de herbicidas (JACOMINI, 2002).

A poluição de ambientes aquáticos por pesticidas tem aumentado, acompanhando o crescimento do uso extensivo desses compostos na agricultura. Uma vasta quantidade de pesticidas é, ou já foi, utilizados na agricultura e também tiveram sua toxicidade testadas, sendo que muitos deles tiveram suas propriedades prejudiciais a espécies naturais comprovadas. Dentre os herbicidas, os mais bem estudados, com diversos trabalhos publicados mostrando efeitos adversos a fauna aquática, são glifosato (ROSSI et al., 2011; GHISI, 2013), atrazina (VENTURA et al., 2008; PIANCINI, 2011; NWANI et al., 2011; MELA et al., 2013a; XING et al., 2015), 2-4-D (MARTÍNEZ-TABCHE et al., 2004; ATEEQ et al., 2005; GONZÁLEZ et al., 2005; ATAMANIUK et al., 2013; MATVIISHYN et al., 2014), entre outros.

Em anos recentes, surgiu uma nova classe de herbicidas, as tricetonas. Dentre estes, destaca-se o mesotrione (2-(4-mesy-2-nitrobenzoyl)cyclohexane-1,3-dione). Ele é classificado como um herbicida seletivo, com aplicação pré ou pós-emergência para o controle de folhas largas anuais e gramíneas na cultura do milho (JOHNSON et al., 2002). O mesotrione é obtido através do isolamento de um aleloquímico leptospermone secretado pela planta da espécie *Callistemon citrinus* (FREITAS et al., 2004). Os

aleloquímicos são compostos secretados por um determinado organismo, capazes de inibir ou estimular seu desenvolvimento e/ou crescimento de outros componentes do ambiente (RICE, 1984). Estes compostos podem ser encontrados nas sementes, folhas, caules e raízes das plantas em quantidades variáveis (PEIXOTO, 1999). Mesotrione é pouco estável no ambiente, e é detectado no solo e água apenas em um pequeno período de tempo após sua aplicação (BARCHANSKA et al., 2012). Devido a essas características químicas e ao banimento da atrazina pela União Europeia, este composto ganhou um grande mercado à partir de 2004.

Por ser uma substância relativamente nova no mercado, existem pouquíssimos trabalhos que testaram possíveis efeitos tóxicos desse composto. Bonnet et al. (2008) testaram a toxicidade da mesotriona, de dois metabólitos, e do produto formulado Callisto® em duas espécies de microorganismos. Valiente Moro et al. (2012) testaram os efeitos desse composto em 3 espécies de microalgas. Crouzet et al. (2010) testaram possíveis efeitos sobre a comunidade microbiana do solo, e finalmente, Kreutz et al. (2008) avaliaram a CL<sub>50</sub> desse composto no peixe neotropical *Rhamdia quelen*.

Espécies reativas de oxigênio (ERO) são continuamente produzidas pelo metabolismo do O<sub>2</sub>. Enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD) e a glutathione peroxidase (GPx) sequestram esses radicais livres prevenindo danos oxidativo. GSH é essencial para o sistema de defesa desses organismos, já que a atividade de GPx e GST dependem de GSH como substrato. Essa molécula muda da forma reduzida (GSH) para a forma oxidada (GSSG) e é reciclada pela glutathione redutase (GR). Mudanças nesse sistema de defesa são indicativos de detoxificação e biotransformação de xenobióticos em animais (VAN DER OOST et al., 2003) e são biomarcadores bioquímicos para o estresse oxidativo produzido por xenobióticos (PAULINO et al., 2012b). ERO também pode causar danos as macromoléculas, como os lipídeos, através

da peroxidação lipídica (LPO) nas membranas, nas proteínas pela carbonilação proteica (PCO) pela oxidação de aminoácidos, e também quebras ao DNA (AZQUETA et al., 2009), que podem ser avaliadas através do ensaio cometa. Todos esses parâmetros podem ser avaliados e tem valores altamente preditivos como biomarcadores de efeitos (LIVINGSTONE, 2003; FERREIRA et al. 2005; FILIPAK NETO et al. 2007; OSÓRIO et al. 2013).

Peixes tem sido modelos experimentais eficientes para a avaliação do potencial tóxico de muitos compostos, bem como na avaliação da saúde de ambientes aquáticos expostos a poluição. *G. brasiliensis* e *O. niloticus* foram escolhidos como bioindicadores no presente trabalho por diversas razões, que incluem sua fácil adaptação a condições laboratoriais, sua ampla distribuição geográfica, importância econômica e fácil obtenção, além de serem amplamente consumidos por humanos. Apesar de estar sendo utilizada em campo a mais de 15 anos, existem pouquíssimos estudos que avaliam possíveis efeitos adversos da mesotriona em organismos vivos, e nenhum teste realizado em peixes utilizando biomarcadores foi realizado. Dessa forma, o presente trabalho tem o objetivo de avaliar se esse composto pode gerar estresse oxidativo e danos ao DNA nessas duas espécies de ciclídeos economicamente importantes.



## MATERIAL E MÉTODOS

Foi preparada uma solução estoque de mesotriona (CAS nº 104206-82-8, pureza 99,5%, Sigma-Aldrich) na concentração de 136,40 mg.L<sup>-1</sup> em água destilada a 22 °C.

Os peixes foram expostos a mesotriona nas concentrações de 1,8; 7; 30; 115 e 460 µg.L<sup>-1</sup>, sendo que 1,8 µg.L<sup>-1</sup> é uma concentração ecologicamente relevante, pois é a concentração carregada a corpos d'água pela chuva (BARCHANSKA et al., 2012). As demais concentrações foram calculadas na magnitude de, aproximadamente, 4x a partir dessa concentração. Só foram testadas concentrações maiores à de carregamento pela chuva pelo fato de a dose de aplicação em campo (200 L.ha<sup>-1</sup>) desse composto ser muito superior a esse valor (SUTTON et al., 2002).

### *Desenho experimental*

Os espécimes de *O. niloticus* (tilápia) e *G. brasiliensis* (acará) foram adquiridos de uma piscicultura localizada na região de Toledo-PR. Os peixes foram aclimatados por 60 dias em tanques de 250 L de água filtrada com aeração constante, temperatura média de 22 °C e alimentados diariamente com ração comercial. Duas semanas antes de iniciar a exposição a mesotriona, 105 peixes foram transferidos para 7 aquários (15 peixes por aquário) de 108 L com condições similares aos tanques. Um aquário foi destinado ao grupo controle negativo (CN), um ao grupo controle positivo (MMS) e os outros as 5 as concentrações teste. Foram feitos dois experimentos separados, um para cada espécie, sendo que em nenhum momento, durante aclimação e exposição, peixes de espécies diferentes compartilharam o mesmo ambiente.

Os animais foram submetidos a contaminação hídrica com mesotriona por um período de 96 horas em sistema estático, e os peixes pertencentes ao grupo controle positivo foram expostos por 24 horas ao MMS por injeção intraperitoneal na concentração

de 0,5 mg.kg<sup>-1</sup>. Após o período de exposição, os peixes foram anestesiados com benzocaína 10% e tiveram uma amostra de sangue coletada por punção da artéria caudal, sendo posteriormente sacrificados por secção medular e tiveram o fígado e as brânquias retirados. O fígado foi retirado inteiro e colocado em uma placa de petri. Uma pequena amostra do órgão foi separada com o auxílio de um bisturi e colocado em um microtubo contendo 500 µL de soro bovino fetal (SBF), a outra parte foi colocada em um microtubo e armazenada a – 80 °C para a realização das análises bioquímicas. Foi retirado o terceiro arco branquial do lado esquerdo de cada peixe e imediatamente lavado em tampão fosfato (PBS, pH 7,4). O osso do arco foi removido e apenas as lamelas foram transferidas para um microtubo contendo 500 µL de SBF.

#### *Ensaio Cometa*

O ensaio cometa com eritrócitos (ECE) foi realizado de acordo com Speit e Hartmann (1999), com modificações segundo Ferraro et al. (2004) e Cestari et al. (2004). Para o ensaio cometa com brânquias (ECB) e fígado (ECF), as amostras foram mecanicamente homogeneizadas (homogenizer Tecnal – TE-103) a 1.500 RPM (RAMSDORF et al., 2009). 20 µL da suspensão celular foram retirados de cada amostra e misturados com 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão (Invitrogen, 0.5%). Os passos seguintes foram feitos de acordo com Speit e Hatmann (1999).

De cada peixe, 100 nucleóides de cada tecido foram analisados de acordo com a classificação visual baseada na migração dos fragmentos de DNA a partir do núcleo. Os resultados foram categorizados em classes de 0 (sem dano) a 4 (dano máximo) (COLLINS et al., 1997).

### *Análises Bioquímicas*

As amostras de fígado foram descongeladas em gelo e pesadas, sendo homogeneizadas na proporção 1:10 (m/V) em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 com auxílio de micro-homogeneizador. O homogeneizado foi centrifugado por 30 minutos a 15.000 x g a 4°C, obtendo-se assim o sobrenadante, do qual foram retiradas alíquotas para cada uma das análises. Atividade da GST foi mensurada a 340 nm (KEEN et al., 1976). A atividade da SOD foi mensurada a 440 nm de acordo com GAO et al. (1998). A atividade da GPx foi mensurada a 340 nm de acordo com PAGLIA & VALENTINE (1976). A concentração de GSH foi obtida de acordo com SEDLAK & LINDSAY (1968), mensurada a 415 nm. A análise da lipoperoxidação (LPO) foi realizada através da avaliação da concentração de hidroperóxidos de acordo com o proposto por JIANG et al. (1992). O conteúdo de proteínas carboniladas (PCO) foi determinada pelo método de LEVINE et al. (1994).

### *Análise Estatísticas*

Os escores obtidos como resultados através do ensaio cometa é calculado através de classes arbitrárias na análise visual, por esse motivo utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para se verificar se havia diferença entre os entre os grupo, com pós teste de Student-Newman-Kleus, com nível de significância de 0,05.

Os dados obtidos através das análises bioquímicas de GST, SOD, GPx, GSH, LPO e PCO tiveram a normalidade testada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Quando os dados obedeceram aos critérios de normalidade utilizou-se ANOVA de uma via, seguida do pós teste de Tukey, com nível de significância de 0,05. Quando os dados não obedeceram aos critérios de normalidade utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com pós teste de Student-Newman-Kleus, com nível de significância de 0,05.

## RESULTADOS

### *Oreochromis niloticus*

A mesotriona mostrou-se genotóxica a eritrócitos de *O. niloticus* nas concentrações de 7, 115 e 460  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (fig. 1A). Em hepatócitos (fig. 1B) e brânquias (fig. 1C) o xenobiótico causou danos ao DNA apenas nas duas maiores concentrações, 115 e 460  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .

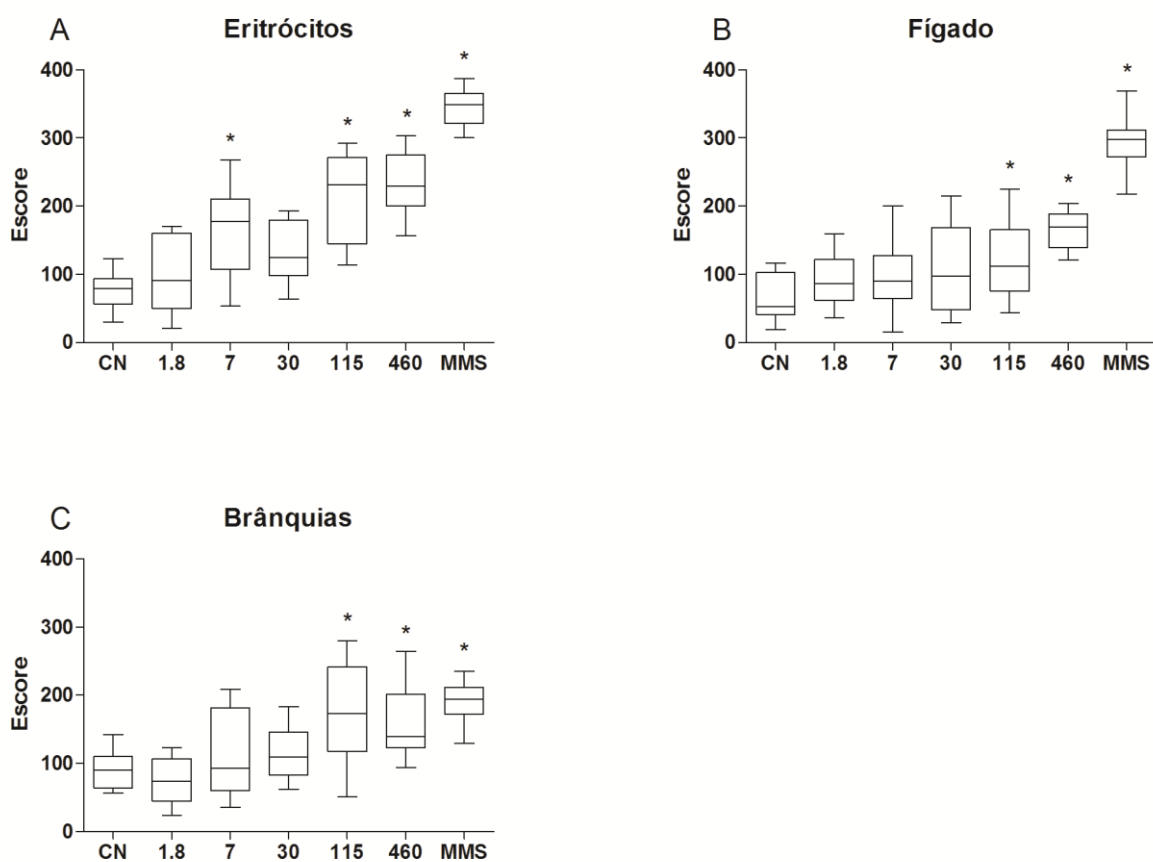


Figura 1: Escores do ensaio cometa de (A) eritrócitos, (B) fígado e (C) brânquias de *O. niloticus* expostas à mesotriona. \* representa diferença estatística entre tratamentos e CN, com  $p < 0,05$ .

Não ocorreu alteração na concentração das enzimas GST (fig. 2A) e SOD (fig. 2B). A atividade de GPx aumentou nos peixes expostos a 7, 30, 115 e 460  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de mesotriona (fig. 2C), já a concentração da GSH foi maior nos tratamentos 7, 30 e 460  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (fig. 2D). A quantidade de peróxidos lipídicos (fig. 2E) e proteínas carboniladas (fig 2F) não se alterou em relação ao CN.

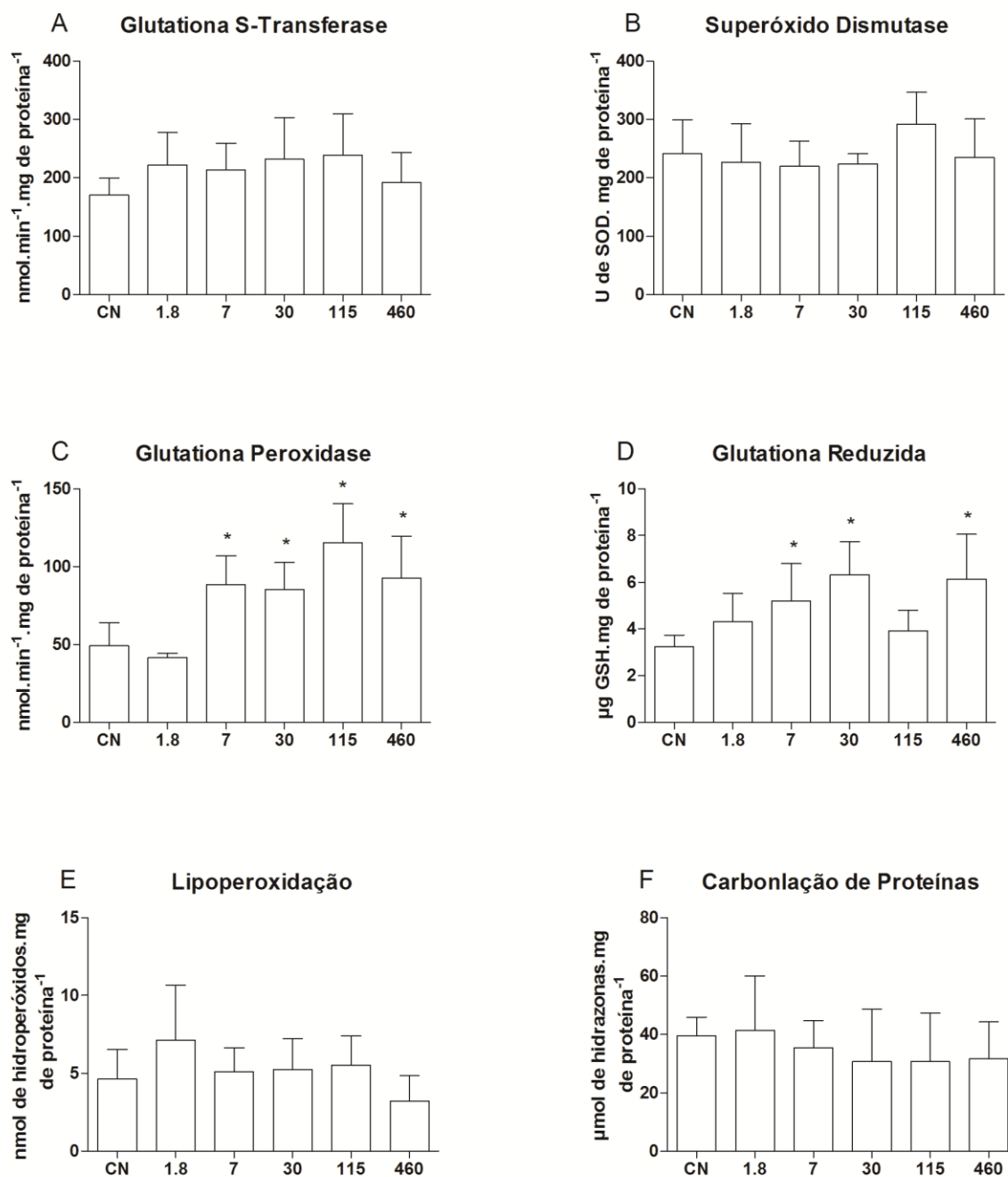


Figura 2: Análises bioquímicas em *O. niloticus* expostas à mesotriona. (A) GST, (B) SOD, (C) GPx, (D) GSH, (E) LPO e (F) PCO. \* representa diferença estatística entre tratamentos e CN, com  $p < 0,05$ .

### *Geophagus brasiliensis*

A mesotriona induziu quebras ao DNA de eritrócitos de *G. brasiliensis* expostos a 30, 115 e 460  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (fig. 3A). Em hepatócitos observou-se aumento no escore dos peixes submetidos a 30 e 460  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (fig. 3B), enquanto que em células das brânquias apenas o tratamento com 115  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de mesotriona induziu aumentou o escore significativamente (fig. 3 C).

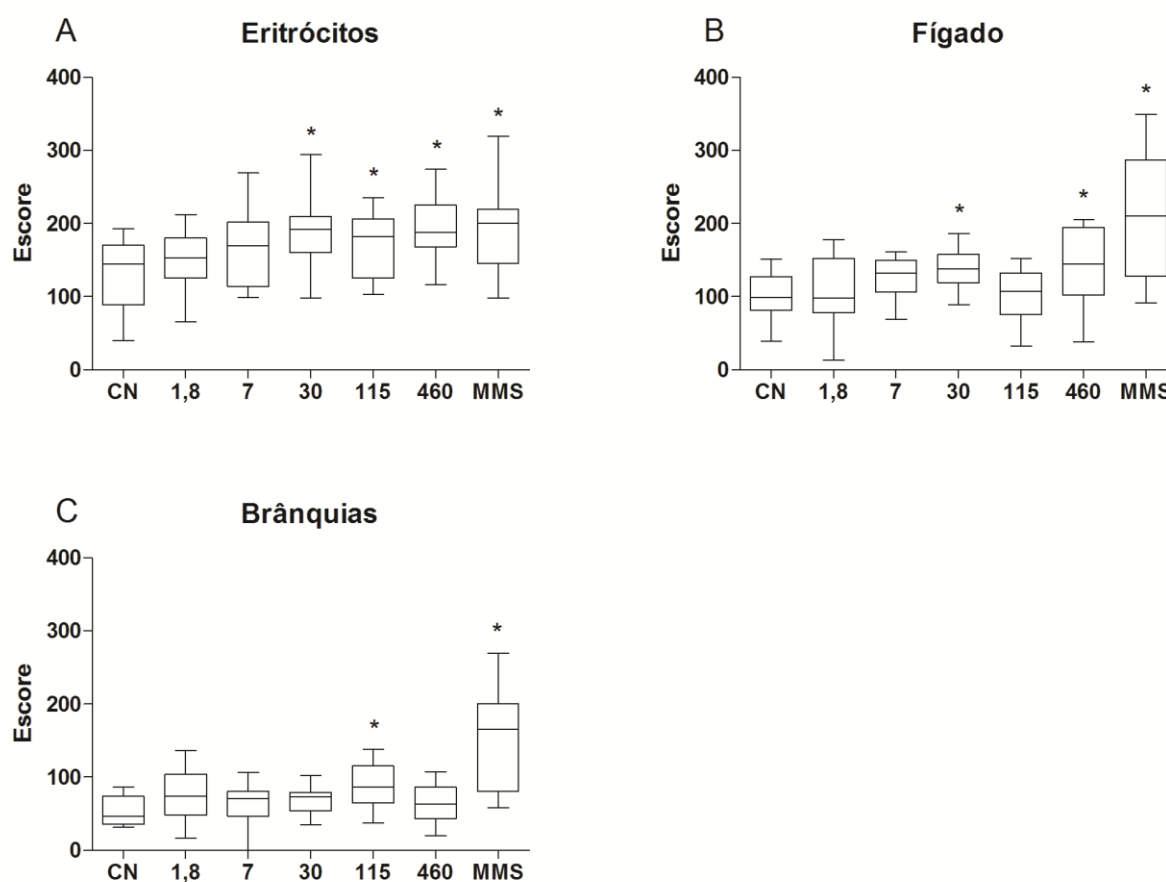


Figura 3: Escores do ensaio cometa de (A) eritrócitos, (B) fígado e (C) brânquias de *G. brasiliensis* expostos à mesotriona. \* representa diferença estatística entre tratamentos e CN, com  $p < 0,05$ .

A GST foi induzida nas concentrações de 7, 30 e 115  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (fig. 4A), e a SOD nas concentrações 115 e 460  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de mesotriona. A atividade da GPx (fig. 4C), bem como a concentração da GSH não se alterou em relação ao controle em nenhum tratamento. A peroxidação lipídica foi significativamente induzida na concentração de 115  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (fig. 4E). Mesmo tendo um aumento aparente de proteínas carboniladas nos grupos 1,8; 7; 115 e 460  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de mesotriona, não ocorreu diferença significativa em relação ao grupo controle (fig. 4F).

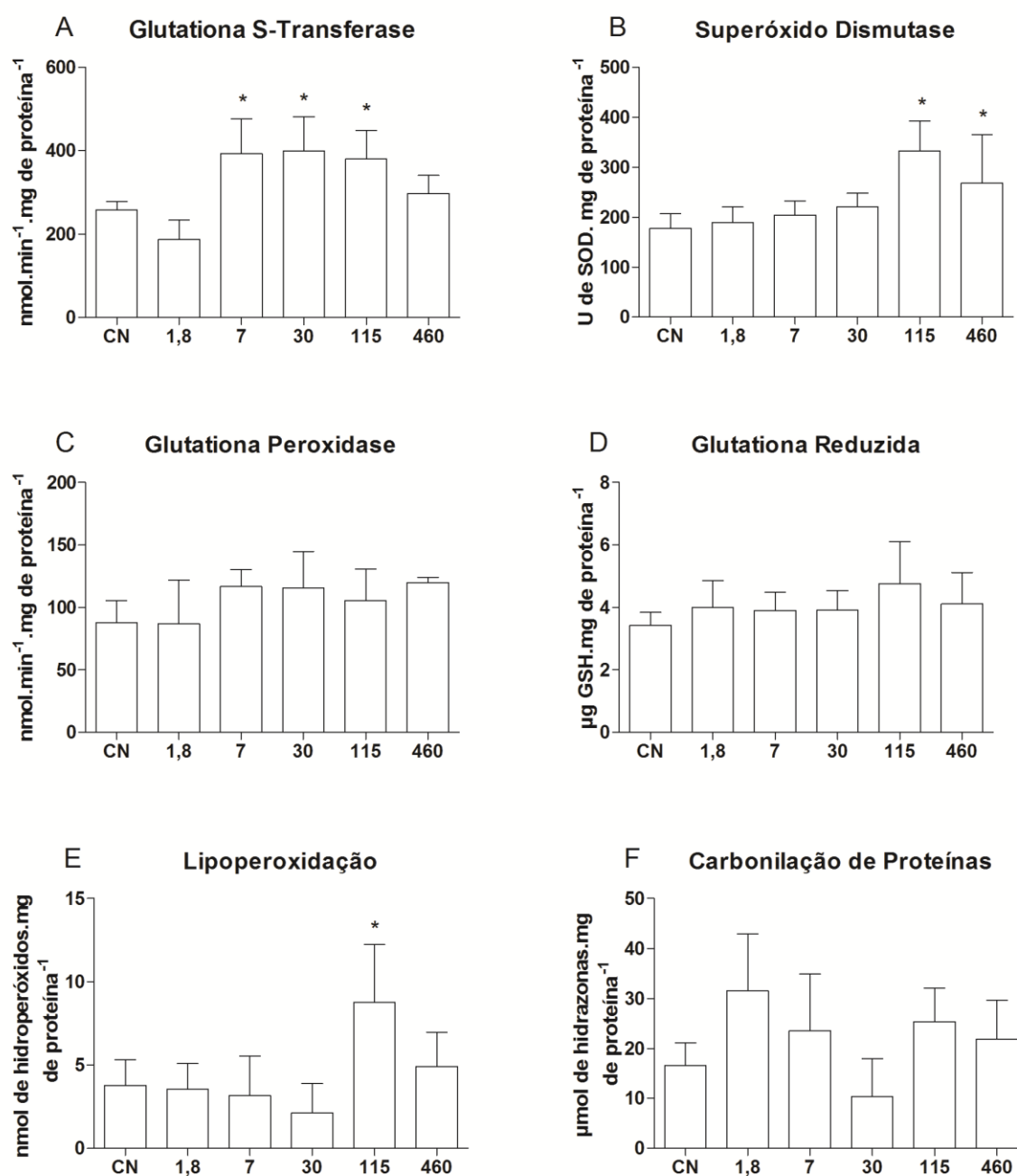


Figura 4: Análises bioquímicas em *G. brasiliensis* expostos à mesotriona. (A) GST, (B) SOD, (C) GPx, (D) GSH, (E) LPO e (F) PCO. \* representa diferença estatística entre tratamentos e CN, com  $p < 0,05$ .

## DISCUSSÃO

Danos ao DNA podem ser causados por diferentes fatores, incluindo as quebras por consequência de estresse oxidativo, ligação direta do xenobiótico ou de seus metabólitos ao material genético. *O. niloticus* expostos a mesotriona tiveram danos ao DNA nos três tecidos testados nas duas maiores concentrações, além da concentração 7  $\mu\text{g.L}^{-1}$  nos eritrócitos. *G. brasiliensis* também tiveram danos significativos ao DNA em todos os tecidos testados. Nos eritrócitos, ocorreu aumento nas concentrações de 30, 115 e 460  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , nos hepatócitos nos tratamentos 30 e 460  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e as brânquias tiveram um pequeno aumento, porém significativo, apenas no grupo 115  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .

Muitos pesticidas são agentes reconhecidamente genotóxicos. Piancini (2011) encontrou efeitos genotóxicos em *Rhamdia quelen* expostos a atrazina (2, 10 e 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) através do teste do micronúcleo pisceio e do ensaio cometa de eritrócitos e brânquias. O mesmo herbicida (nas concentrações de 6,25; 12,5 e 25  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) aumentou a frequência de alterações morfológicas nucleares e as quebras ao DNA em tilápia (VENTURA et al., 2008). GHISI et al. (2013) encontraram aumento significativo de danos ao material genético de células sanguíneas e hepatócitos de *Corydoras paleatus* expostos a concentrações subletais de glifosato. Esse mesmo herbicida causou quebras ao DNA, bem como aumento de estresse oxidativo em *Astyanax sp.* (ROSSI et al., 2011). Outro herbicida triazinico, o 2-4-D (75 e 150  $\text{mg.L}^{-1}$ ) também foi capaz de induzir estresse oxidativo e genotoxicidade em *Oncorhynchus mikiss* (MARTÍNEZ-TABCHE et al., 2004).

Nossos dados mostram que, não diferentemente dos demais herbicidas extensamente utilizados na agricultura, a mesotriona é capaz de induzir danos ao material genético de peixes tanto em células do sistema circulatório (como os eritrócitos) quanto em células de tecidos hepáticos e branquiais.



Apesar de não observarmos aumento na formação de peróxidos lipídicos (LPO) no fígado de *O. niloticus*, a concentração de GPx estava elevada em quase todos os grupos teste, e a GSH nos grupos 7, 30 e 460  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . GSH serve como molécula endobiótica na detoxificação de diversos substratos (ARMSTRONG, 1997; VAN BLADEREN, 2000) e na redução de hidroperóxidos orgânicos (ROOH) pelas GST (ARTEEL e SIES, 2001). Além disso, o GSH participa na redução do próprio  $\text{H}_2\text{O}_2$  nas reações catalisadas pelas glutathione peroxidases (GPx) e reage prontamente com  $\text{HO}^-$  (NETO, 2007). Portanto, o aumento de GSH e GPx indicam que o sistema de proteção à hidroperóxidos estava ativo, e protegendo os organismos contra danos a macromoléculas como lipídeos e proteínas, mas não o DNA. A indução de estresse oxidativo por pesticidas é bem estudada, ocorrendo em diversas espécies, incluindo peixes. (MELA et al., 2013a), observaram uma diminuição na expressão das enzimas GPx, GST e CAT, acompanhadas de uma redução nas concentrações de GSH e GR em *Rhamdia quelen* expostos ao herbicida atrazina. Esse herbicida tem a capacidade de se ligar a GSH, diminuindo sua concentração, bem como a atividade de GST e GPx, que utilizam essa molécula como substrato. Nessa mesma espécie, Glusczak et al. (2007) observaram aumento de ERO em músculo de *R. quelen* expostas a 0,2 e 0,4  $\text{mgL}^{-1}$  de glifosato. Aumento da concentração de SOD e GPx também ocorreu em brânquias de *Carassius auratus* expostos ao herbicida 2-4-D (ATAMANIUK et al., 2013).

Nos *G. brasiliensis* a concentração de superóxido dismutase (SOD) estava aumentada nos grupos 115 e 460  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , mostrando que os organismos estavam reagindo a presença de ERO. Uma das primeiras enzimas a atuar na defesa contra ERO é a SOD, capaz de converter o ânion superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio, por sua vez, será eliminado pela ação da enzima catalase (CAT), transformando-se em oxigênio e água, ou então será neutralizado por outra enzima, a

GPx, capaz de degradar esse e outros tipos de peróxidos através da oxidação da GSH (SANTOS e MARTINEZ, 2012). Nossos resultados não evidenciam aumento da GPx nessa espécie, porém, ocorre aumento significativo da GST nos grupos 7, 30 e 115  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . A GST está presente no citosol de muitas células catalisando a conjugação da GSH com compostos de núcleo eletrofílico e também atua na eliminação de radicais de oxigênio e intermediários reativos (RIOL et al., 2000), que por ventura podem estar sendo formados a partir da ação da superóxido dismutase.

A mesotriona é um composto de rápida degradação, porém, concentrações de aproximadamente 1,8  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de mesotriona pode ser carregada pela chuva para dentro dos corpos d'água. Essa concentração foi testada em nosso trabalho, e não se mostrou genotóxica nem induziu qualquer tipo de alteração à nível bioquímico. Kreutz et al. (2008) avaliou a  $CL_{50}$  de vários pesticidas a espécie de peixe neotropical *Rhamdia quelen*, e constatou que a mesotriona tem uma concentração letal muito superior a outros pesticidas. Enquanto a  $CL_{50}$  da mesotriona é 532  $\text{mg.L}^{-1}$  para essa espécie, a  $CL_{50}$  de pesticidas como o glifosato, atrazina e tebuconazole são 7,3  $\text{mg.L}^{-1}$ , 7,2  $\text{mg.L}^{-1}$  e 5,3  $\text{mg.L}^{-1}$ , respectivamente.

O fato da mesotriona ser rapidamente degradada no solo não quer dizer que o produto não é tóxico ao meio ambiente. Nem todos os produtos de degradação desse herbicida são conhecidos. MNBA (*4-methylsulfonyl-2-nitrobenzoic acid*) e AMBA (*2-amino-4-methylsulfonylbenzoic acid*), entre outros metabólitos da mesotriona, são encontrados juntos com o produto parental no solo e na água (ALFERNES e WIEBE 2002). BONNET et al. (2008) compararam a toxicidade da atrazina com a da mesotriona e seu produto formulado comercial (Callisto®), além de seus dois metabólitos mais conhecidos (MNBA e AMBA) em dois microrganismos utilizados em ensaios de ecotoxicidade, o eucarioto *T. pyriformis* e o procarioto *V. fischeri*. Os resultados

mostraram que o produto formulado Callisto® é mais tóxico para as duas espécies em relação a atrazina, além de ser aproximadamente 80x mais tóxico que o mesotrione para *V. fischeri*. Para esse mesmo microrganismo, um dos produtos de degradação, o AMBA foi aproximadamente 6x mais tóxico que a mesotriona. Em outro trabalho, Ter Halle e Richard (2006) mostraram que muitos fotoprodutos são formados na água na natureza, mas apenas três foram identificados, sendo o MNBA um deles. AMBA foi identificado como um metabólito presente entre muitos, em relativamente alta concentração, entre os produtos da biotransformação na linhagem bacteriana *Bacillus sp.* 3B6 (DURAND et al. 2006a; 2006b).

## CONCLUSÕES

Nossos dados são pioneiros na utilização de biomarcadores em peixes para testar possíveis efeitos adversos da mesotrione. Para as duas espécies o composto foi genotóxico em concentrações muito inferiores a concentrações de aplicação em campo, bem como foi induzido a resposta de enzimas de resposta a ERO. A quantidade de GSH aumentou, bem como a atividade da GPx nas s, e a GST e SOD em *G. brasiliensis*. A mesotriona também foi capaz de causar danos oxidativos à lipídeos, mas não a proteínas.

Apesar de não parecer danosa na concentração atualmente encontrada na natureza, nossos resultados mostram que deve-se ter cautela no uso desse herbicida, pois em concentrações baixas ele foi capaz de induzir genotoxicidade e geração de ERO em peixes. Soma-se a isso o fato de que um dos produtos de degradação no solo e água apresenta maior toxicidade do que a própria mesotriona em *V. fischeri*, além de que o produto formulado utilizado no campo é mais tóxico do que o princípio ativo testado em nosso trabalho. Dessa forma, para que se tenha um conhecimento mais amplo do real potencial de contaminação da mesotriona ao meio ambiente, faz-se necessário mais testes de toxicidade desse composto, identificando seus metabólitos, bem como do produto comercial.

### 3.3 CAPÍTULO III

## **AVALIAÇÃO AGUDA DO POTENCIAL GENOTÓXICO E DE INDUÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO DA MISTURA DOS HERBICIDAS ATRAZINA E MESTRIONA EM DUAS ESPÉCIES DE CICLÍDEOS**

L. D. S. Piancini<sup>a</sup>; I. C. Guiloski<sup>b</sup>; H. L. S. Gonçalves<sup>a</sup>; H. C. Silva de Assis<sup>b</sup>; M. M. Cestari<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Universidade Federal do Paraná, Departamento de Genética, Curitiba, Paraná, Brasil*

<sup>b</sup> *Universidade Federal do Paraná, Departamento de Farmacologia, Curitiba, Paraná, Brasil*

## RESUMO

O uso de pesticidas aumentou nas últimas décadas, com a transformação de sistemas de produção agrícola convencionais em sistemas altamente tecnológicos. A mistura de herbicidas tem sido utilizada como uma alternativa visando aumentar o espectro de controle das plantas daninhas e a eficácia dos herbicidas. Organismos aquáticos, como os peixes, são suscetíveis a exposição a misturas de químicos provenientes de atividades agrícolas. Com a crescente utilização da mistura entre atrazina e mesotriona nos cultivares de milho em diversas localidades, faz-se necessário testar se essa mistura pode alterar as características tóxicas desses dois compostos em peixes. Foi feita a avaliação dessa mistura em três tratamentos distintos, através de biomarcadores de estresse oxidativo e danos ao DNA em duas espécies de peixes. Nossos resultados mostram que a mistura entre atrazina e mesotriona causou poucas alterações de resposta ao estresse oxidativo. No entanto a combinação desses herbicidas levou a danos ao material genético de ambas as espécies em concentrações que quando isoladas não causam tal efeito. O aumento da frequência de alterações morfológicas nucleares e micronúcleos mostra que essa combinação é potencialmente citotóxica, e em *O. niloticus* reduz a renovação dos eritrócitos circulantes.

## INTRODUÇÃO

Peixes servem como bioindicadores de poluição ambiental bem como na avaliação de risco associada a contaminação do ambiente aquático, pois estes animais estão diretamente expostos aos químicos provenientes da produção agrícola, seja pelo escoamento superficial pelas chuvas ou indiretamente pela cadeia alimentar (NWANI et al., 2010). Além disso, o uso de pesticidas aumentou nas últimas décadas, com a transformação de sistemas convencionais em sistemas altamente tecnológico para satisfazer a demanda mundial por alimentos, rações, fibras e combustíveis (BRODEUR et al., 2014)

A cultura do milho está entre as mais importantes do Brasil com uma área plantada em torno de 14 milhões de hectares e produtividade média de 3.670 kg/ha (IBGE, 2009). As condições edafoclimáticas destacam o Brasil como um país de grande potencial para a cultura do milho, entretanto, o clima tropical é também muito propício à ocorrência de uma grande quantidade de plantas daninhas. Existem diversos métodos para se controlar as plantas daninhas na agricultura, sendo os mecânicos e o controle químico os mais utilizados. Além disso, as misturas de herbicidas tem sido utilizadas como uma alternativa visando aumentar o espectro de controle das plantas daninhas e a eficácia dos herbicidas. (ZAGONEL e FERNANDES, 2007).

Diversos pesticidas e contaminantes são frequentemente encontrados em baixas concentrações ao longo do ano, sendo que herbicidas são detectados em cerca de 70-90% das amostras na América do Norte (GILLIOM et al., 2006; GIROUX e PELLETIER, 2012). A atrazina (ATZ) é utilizada desde os anos 1950 em diversos cultivares (Azevedo et al. 2004), no entanto esse herbicida tem um amplo potencial de contaminação em diferentes compartimentos ambientais, como o solo, águas superficiais e subterrâneas (BOLOGNESI 2003). As concentrações detectadas em águas de escoamento estão entre

0,2 a 20  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (SELIM, 2003), enquanto em córregos e rios adjacentes a áreas de cultivo esse valor pode alcançar até 1000  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (GRAYMORE et al., 2001). A ATZ foi banida na União Europeia em 2004, mas continua sendo utilizada em grande quantidade nos demais continentes, inclusive no Brasil.

Para substituir a ATZ, diversos herbicidas seletivos foram desenvolvidos, dentre eles a Mesotriona, o *S-metolachlor*, o *benoxacor* e o *nicosulfuron*. Esses produtos pertencem a diferentes famílias e tem diferentes modos de ação (JOLY et al., 2013). Apesar disto, nos países onde a ATZ não foi banida, esses herbicidas ganharam espaço, sendo utilizados em mistura com a ATZ para que o espectro de ação herbicida da aplicação em campo seja ampliado (JAMES et al., 2006; ZAGONEL e FERNANDES, 2007). A mesotriona é classificada como um herbicida seletivo, com aplicação pré ou pós-emergência para o controle de folhas largas anuais e gramíneas na cultura do milho (JOHNSON et al., 2002). Aumento na toxicidade do produto comercial formulado (Callisto®) comparado ao princípio ativo e dois produtos de degradação da mesotriona (MNBA e AMBA) foi encontrado por Bonnet et al., (2008). Kreutz et al. (2008) avaliaram a  $CL_{50}$  da mesotriona em *Rhamdia quelen*, encontrando valores de 532  $\text{mg.L}^{-1}$ , muito superior em comparação a outros herbicidas, como a atrazina, que tem a  $CL_{50}$  para essa mesma espécie na concentração de 10,2  $\text{mg.L}^{-1}$ .

Organismos aquáticos, como os peixes, são suscetíveis a exposição a misturas de químicos provenientes de atividades agrícolas, com flutuação de composição e concentração dessas misturas (BRODEUR et al., 2014). A quantificação e a caracterização da toxicidade de misturas específicas é de extrema importância uma vez que irá, eventualmente, permitir o desenvolvimento de métodos para avaliar o risco que elas representam no mundo real (MUMTAZ, 2010).



Biomarcadores são respostas mensuráveis nos peixes usadas para integrar dados bióticos (bioindicadores) e abióticos (exposição a um contaminante), e providenciar informações sobre a ação do xenobiótico (VAN DER OOST et al. 2003). Espécies reativas de oxigênio (ERO) são continuamente produzidas pelo metabolismo do O<sub>2</sub>. Enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD) e a glutathione peroxidase (GPx) sequestram esses radicais livres prevenindo danos oxidativo. GSH é essencial para o sistema de defesa desses organismos, já que a atividade de GPx e GST dependem de GSH como substrato. Essa molécula muda da forma reduzida (GSH) para a forma oxidada (GSSG) e é reciclada pela glutathione reductase (GR). Mudanças nesse sistema de defesa são indicativos de detoxificação e biotransformação de xenobióticos em animais (VAN DER OOST et al., 2003) e são biomarcadores bioquímicos para o estresse oxidativo produzido por xenobióticos (PAULINO et al., 2012b). As ERO também pode causar danos as macromoléculas, como os lipídeos, pela peroxidação lipídica (LPO) nas membranas, nas proteínas pela carbonilação proteica (PCO) pela oxidação de aminoácidos, e também quebras ao DNA (AZQUETA et al., 2009).

Com a crescente utilização da mistura entre atrazina e mesotriona nos cultivares de milho em diversas localidades, faz-se necessário testar se essa mistura pode alterar as características tóxicas desses dois compostos sobre organismos aquáticos. O *Geophagus brasiliensis* e o *Oreochromis niloticus* foram escolhidos como organismos teste no presente trabalho por diversas razões, que incluem sua fácil adaptação a condições laboratoriais, por serem grandemente distribuídos e de fácil obtenção, além de serem amplamente consumidos por humanos. Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo avaliar se a mistura entre esses dois herbicidas pode alterar o potencial tóxico dos compostos, causando sinergia ou antagonismo, aumentando ou diminuindo a resposta ao estresse oxidativo e danos ao DNA nessas espécies submetidas a bioensaios

de exposição hídrica aguda de 96 horas aos herbicidas em conjunto, em três misturas distintas.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram preparadas soluções estoque de ATZ (CAS n° 1912-24-9, pureza 98.8%, Sigma-Aldrich) e de mesotriona (CAS n° 104206-82-8, pureza 99,5%, Sigma-Aldrich) nas concentrações de 0,022 g.L<sup>-1</sup> a 22 °C e de 136,40 mg.L<sup>-1</sup> a 22 °C, respectivamente.

As misturas foram preparadas de acordo com os resultados obtidos nos capítulos I e II deste documento. O critério estabelecido para escolhermos as concentrações para fazermos as misturas foi danos às macromoléculas (DNA, lipídeos e proteínas). Para cada espécie, as maiores concentrações dos herbicidas que não causaram efeitos adversos em qualquer macromolécula, nos capítulos I e II, foram misturadas e nomeadas M 1 (MT 1 e MA1 em *O. niloticus* e *G. brasiliensis*, respectivamente). As menores concentrações de ATZ e mesotriona que causaram alguma alteração em pelo menos um biomarcador das macromoléculas foram misturadas e nomeadas M 2 (MT 2 para *O. niloticus* e MA 2 para *G. brasiliensis*). No entanto, em *O. niloticus* expostas a ATZ (capítulo I), a menor concentração aumentou danos a lipídios e DNA nas brânquias. Logo, ficou estabelecido que para essa espécie, a menor concentração testada desse herbicida seria a MT 1, sendo MT 2 o tratamento seguinte. As maiores concentrações tanto de atrazina quanto da mesotriona foram misturadas, formando o grupo M 3 (MT 3 e MA 3, para *O. niloticus* e *G. brasiliensis*, respectivamente). Os tratamentos tem os herbicidas nas concentrações conforme a tabela 1.

TABELA 1 – Concentrações dos herbicidas nos diferentes tratamentos nas espécies *O. niloticus* (tilápia) e *G. brasiliensis* (acará).

	<i>O. niloticus</i>			<i>G. brasiliensis</i>		
	MT 1	MT 2	MT 3	MA 1	MA 2	MA 3
ATZ	1,5 µg.L <sup>-1</sup>	6,25 µg.L <sup>-1</sup>	400 µg.L <sup>-1</sup>	6,5 µg.L <sup>-1</sup>	25 µg.L <sup>-1</sup>	400 µg.L <sup>-1</sup>
MESO	1,8 µg.L <sup>-1</sup>	7 µg.L <sup>-1</sup>	460 µg.L <sup>-1</sup>	7 µg.L <sup>-1</sup>	30 µg.L <sup>-1</sup>	460 µg.L <sup>-1</sup>

### *Desenho experimental*

Os espécimes de tilápia e acará foram adquiridos de uma piscicultura localizada na região de Toledo-PR. Os peixes foram aclimatados por 60 dias em tanques de 250 L de água filtrada com aeração constante, temperatura média de 22°C e alimentados diariamente. Duas semanas antes de iniciar a exposição as misturas, 105 peixes foram transferidos para 7 aquários (15 peixes por aquário) de 108 L com condições similares aos tanques (densidade menor do que 1g.L<sup>-1</sup>). Um aquário foi destinado ao grupo controle negativo (CN), um ao grupo controle positivo (MMS) e os outros para as 3 misturas testadas. Foram feitos dois experimentos separados, um para cada espécie, sendo que em nenhum momento, durante aclimação e exposição, peixes de espécies diferentes compartilharam o mesmo ambiente.

Os animais foram submetidos as misturas através de exposição hídrica por um período de 96h, e os peixes pertencentes ao grupo controle positivo foram expostos ao MMS por injeção intraperitoneal na concentração de 0,5 mg.kg<sup>-1</sup> 24 horas antes de serem sacrificados. Após o período de exposição, os peixes foram anestesiados com benzocaína 10% e tiveram uma amostra de sangue coletada por punção da veia caudal, depois foram sacrificados por secção medular e tiveram fígado e brânquias retirados para as análises. O fígado foi retirado inteiro e colocado em uma placa de petri. Uma amostra de aproximadamente 3mm<sup>3</sup> do órgão foi separada com o auxílio de um bisturi e colocada em

um microtubo contendo 500 µL de soro bovino fetal (SBF), o restante do fígado foi colocado em um microtubo e armazenado a -80 °C para a realização das análises bioquímicas. Foi retirado o terceiro arco branquial do lado esquerdo de cada peixe, esse arco foi então colocado em uma placa de Petri e lavado com tampão fosfato (PBS, pH 7,4). O osso do arco foi removido e apenas as lamelas foram transferidas para um microtubo contendo 500 µL de SBF.

#### *Teste do micronúcleo pisceo*

O teste do micronúcleo pisceo (MNT) com coloração de laranja de acridina foi realizado de acordo com Çavas e Ergene-Gözükar (2005) com o intuito de determinar a frequência de micronúcleos, alterações morfológicas nucleares (CARRASCO et al., 1990) e verificar o efeito do contaminante no processo de eritropoiese através da frequência de eritrócitos policromáticos.

#### *Ensaio Cometa*

O ensaio cometa com eritrócitos (ECE) foi realizado de acordo com Speit e Hartmann (1999), com modificações segundo Ferraro et al. (2004) e Cestari et al. (2004). Para o ensaio cometa com brânquias (ECB) e fígado (ECF), as amostras foram mecanicamente homogeneizadas a 1.500 RPM (homogenizer Tecnal – TE-103). 20 µL da suspensão celular foram retirados de cada amostra e misturados com 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão (Invitrogen, 0.5%). Os passos seguintes foram de acordo com Speit e Hartmann (1999).

De cada peixe, 100 nucleóides de cada tecido foram analisados de acordo com a classificação visual baseada na migração dos fragmentos de DNA a partir do núcleo. Os resultados foram categorizados em classes de acordo com Collins et al. (1997).

### *Análises Bioquímicas*

As amostras de fígado foram descongeladas em gelo moído e pesadas, sendo homogeneizadas na proporção 1:10 (m/V) em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 com auxílio de micro-homogeneizador. O homogeneizado foi centrifugado por 30 minutos a 15.000 x g a 4°C, obtendo-se assim o sobrenadante, do qual foram retiradas alíquotas para cada uma das análises. Atividade da GST foi mensurada a 340 nm (KEEN et al., 1976). A atividade da SOD foi mensurada a 440 nm de acordo com Gao et al. (1998). A atividade da GPx foi mensurada a 340 nm de acordo com Paglia e Valentine (1976). A concentração de GSH foi obtida de acordo com Sedlak e Lindsay (1968), mensurada a 415 nm. A análise da lipoperoxidação (LPO) foi realizada através da avaliação da concentração de hidroperóxidos de acordo com o proposto por Jiang et al. (1992). O conteúdo de proteínas carboniladas (PCO) foi determinada pelo método de Levine et al. (1994).

### *Análise Estatísticas*

Os escores obtidos como resultados através do ensaio cometa é calculado através de classes arbitrárias na análise visual, por esse motivo utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para se verificar se havia diferença entre os entre os grupos, com pós teste de Student-Newman-Kleus, com nível de significância de 0,05.

Os dados obtidos pelo MNT e através das análises bioquímicas de GST, SOD, GPx, GSH, LPO e PCO tiveram a normalidade testada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Quando os dados obedeceram aos critérios de normalidade utilizou-se ANOVA de uma via para determinar se havia diferença entre os tratamentos, seguida do pós teste de Bonferroni para demonstrar as diferenças entre os grupos, com nível de significância de 0,05. Quando os dados não obedeceram aos critérios de normalidade utilizou-se o

Teste de Kruskal-Wallis, para verificar se havia diferença entre os grupos, com pós teste de Student-Newman-Kleus, com nível de significância de 0,05.

## RESULTADOS

### *Oreochromis niloticus*

Foi observado aumento de danos ao DNA no ECE em todos os tratamentos testados (fig. 1A). No ECF, escores significativamente maiores foram observados em MT 2 (fig. 1B), enquanto que em ECB ocorreu aumento nas misturas MT 1 e MT 2 (fig. 1C).

Através de MNT, pudemos notar aumento na frequência de alterações morfológicas totais (AMN) no tratamento MT 3. Nesse grupo, alterações do tipo *blebbed*, *notched* e binúcleo, além da frequência de micronúcleos, foram superiores em relação ao grupo controle. Já frequência de eritrócitos policromáticos diminuiu nos tratamentos MT 2 e MT 3 (tabela 1).

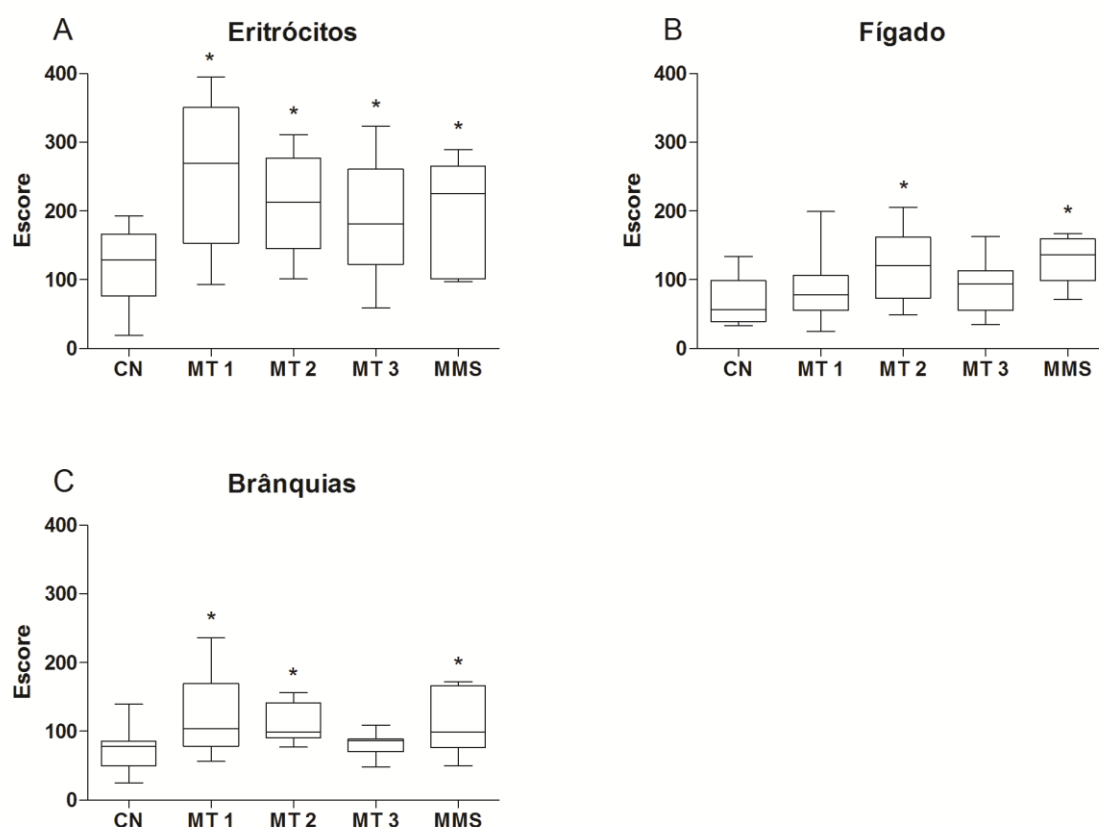


Figura 1: Escores do ensaio cometa de (A) eritrócitos, (B) fígado e (C) brânquias de *O. niloticus* expostas à três diferentes misturas de atrazina e mesotriona. \* representa diferença estatística entre tratamentos e CN, com  $p < 0,05$ .

TABELA 1 - Frequências das alterações morfológicas nucleares, micronúcleos e eritrócitos policromáticos em *O. niloticus* expostos a três diferentes misturas de atrazina e mesotriona.

	MN	BL	LB	BN	NT	VC	AMN	POLI
CN	0.15 ± 0.10	6.46 ± 1.42	4.00 ± 1.76	0	44.38 ± 11.91	0.38 ± 0.21	55.38 ± 14.60	172.5 ± 43.31
MT 1	0.13 ± 0.09	6.40 ± 1.12	4.86 ± 1.23	0	30.27 ± 3.83	0.93 ± 0.33	42.60 ± 5.20	121.8 ± 22.13
MT 2	0.30 ± 0.13	5.69 ± 1.83	3.76 ± 1.40	0	38.85 ± 10.23	0.38 ± 0.24	46.43 ± 12.39	48.38 ± 13.6 *1
MT 3	1.60 ± 0.44 *	30.00 ± 4.63 *	6.26 ± 1.24	0.26 ± 0.11 *	155.2 ± 19.37 *	0.53 ± 0.29	193.9 ± 22.48 *	25.40 ± 13.83 *
MMS	0.20 ± 0.13	7.60 ± 3.53	5.80 ± 4.33	0	30.00 ± 8.74	1.40 ± 0.93	45.00 ± 16.93	127.3 ± 29.52

(MN) micronúcleos, (BL) blebbed, (LB) lobed, (BN) binúcleo, (NT) notched, (VC) vacúolos, (AMN) alterações morfológicas totais e (POLI) eritrócitos policromáticos.

\* representa diferença estatística entre tratamentos e CN pelo teste ANOVA, com  $p < 0,05$ .



Não observamos alterações significativas nas atividades das enzimas GST, SOD e GPx (fig 2 A, B e C, respectivamente). A GSH, apesar de ter uma aparente diminuição em sua concentração em todas as concentrações, não teve diferença significativa em relação ao CN (fig. 2D). LPO e PCO não tiveram alterações quando comparadas a CN (fig. 2 E e F).

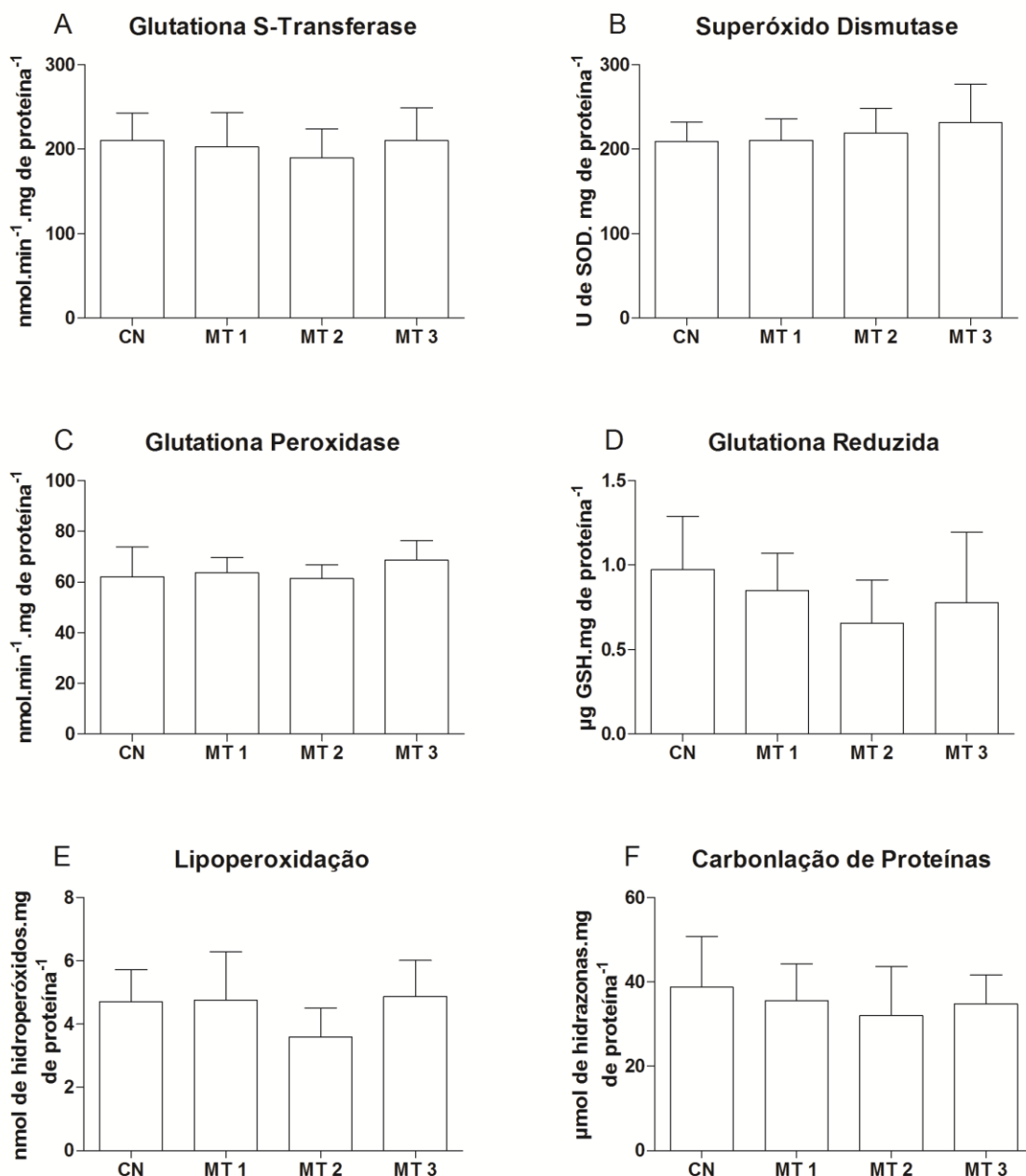


Figura 2: Análises bioquímicas em *O. niloticus* expostas à três diferentes misturas de atrazina e mesotriona. (A) GST, (B) SOD, (C) GPx, (D) GSH, (E) LPO e (F) PCO. \* representa diferença estatística entre tratamentos e CN, com  $p < 0,05$ .

### *Geophagus brasiliensis*

Através do ECE, não observamos nenhuma alteração entre os tratamentos e o CN (fig. 3A), mas ocorreu aumento significativo nos danos ao DNA de hepatócitos (ECF) em todos os tratamentos (fig. 3B). Em ECB ocorreu aumento nos escores nos tratamentos MA 2 e MA 3 (fig. 3C).

A frequência de MN aumentou em MA 2 e MA 3, no entanto a frequência de AMN foi maior em todos os tratamentos. Alterações do tipo *blebbed* foram mais frequentes em MA 2, enquanto *notched* tiveram um aumento significativo em MA 2 e MA 3. Quanto a frequência de eritrócitos policromáticos, não ocorreu diferença significativa entre CN e qualquer um dos tratamentos (tabela 2).

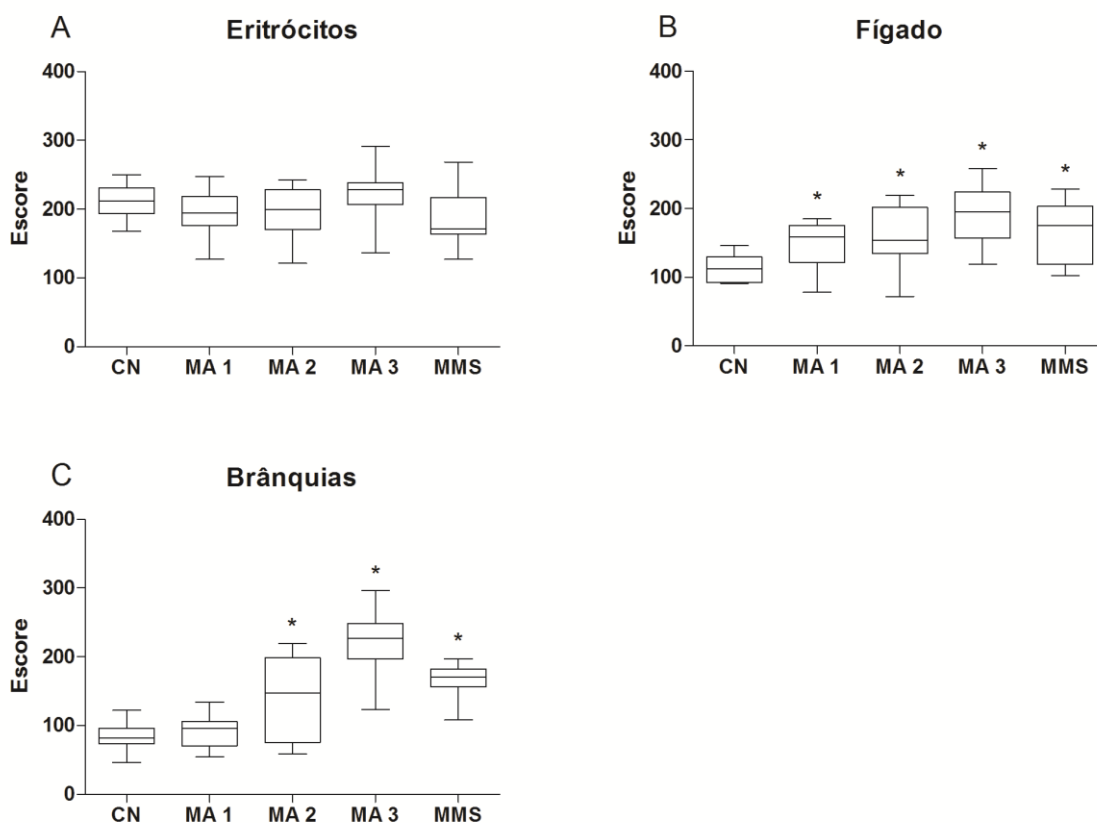


Figura 3: Escores do ensaio cometa de (A) erit'rócitos, (B) fígado e (C) brânquias de *G. brasiliensis* expostos à três diferentes misturas de atrazina e mesotriona. \* representa diferença estatística entre tratamentos e CN, com  $p < 0,05$ .

TABELA 2 - Frequências das alterações morfológicas nucleares, micronúcleos e eritrócitos policromáticos em *G. brasiliensis* expostos a três diferentes misturas de atrazina e mesotriona.

	MN	BL	LB	BN	NT	VC	AMN	POLI
CN	0.06 ± 0.06	8.20 ± 1.43	3.46 ± 1.05	0.46 ± 0.16	43.27 ± 7.37	0.20 ± 0.14	59.60 ± 9.79	126.1 ± 30.82
MA 1	1.71 ± 0.49	17.29 ± 3.76	4.78 ± 1.51	0.42 ± 0.22	105.6 ± 17.76	0.78 ± 0.23	122.3 ± 21.78 *	91.57 ± 32.21
MA 2	2.78 ± 0.74 *	25.93 ± 4.66 *	3.35 ± 1.31	0.57 ± 0.22	138.4 ± 20.17 *	0.21 ± 0.15	162.0 ± 26.81 *	103.9 ± 22.24
MA 3	2.46 ± 0.57 *	19.27 ± 3.24	6.26 ± 1.08	0.06 ± 0.06	127.5 ± 18.98 *	1.73 ± 0.89	153.4 ± 22.08 *	89.47 ± 18.80
MMS	1.77 ± 0.72	14.89 ± 4.23	2.00 ± 0.74	0.66 ± 0.44	115.3 ± 27.38	0.11 ± 0.11	134.8 ± 31.07 *	139.9 ± 50.73

(MN) micronúcleos, (BL) *blebbed*, (LB) *lobed*, (BN) binúcleo, (NT) *notched*, (VC) vacúolos, (AMN) alterações morfológicas totais e (POLI) eritrócitos policromáticos.  
 \* representa diferença estatística entre tratamentos e CN pelo teste ANOVA, com  $p < 0,05$ .

Não ocorreram alterações na atividade da GST e GPx (fig. 4 A e C), no entanto ocorreu redução significativa da atividade da SOD nos tratamentos MA 1 e MA 2 (fig. 4B). Observamos redução significativa na concentração de GSH em MA 3 (fig. 4D), porém LPO e PCO não tiveram alterações em nenhum tratamento (fig. 4 E e F).

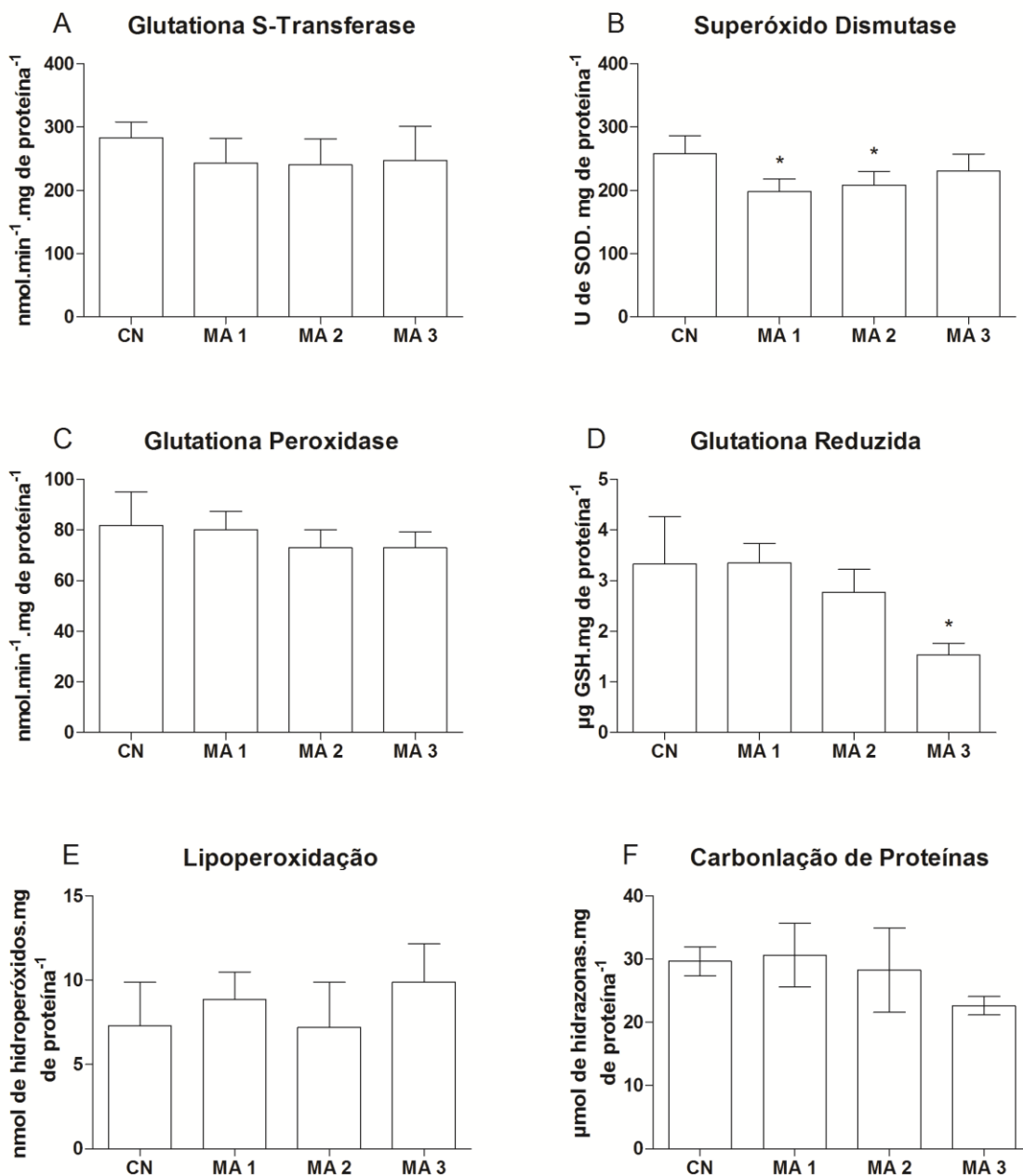


Figura 4: Análises bioquímicas em *G. brasiliensis* expostos à três diferentes misturas de atrazina e mesotriona. (A) GST, (B) SOD, (C) GPx, (D) GSH, (E) LPO e (F) PCO. \* representa diferença estatística entre tratamentos e CN, com  $p < 0,05$ .

## DISCUSSÃO

Os efeitos dos pesticidas aos organismos são frequentemente investigados usando-se apenas um agente tóxico sob condições laboratoriais. No entanto, em condições ambientais, misturas de pesticidas e metabólitos estão frequentemente presentes e podem causar efeitos interativos. É conhecido que alguns contaminantes quando em presença de outros tem seus efeitos aumentados (sinergia) ou diminuídos (antagonismo). Estudos anteriores mostraram que a ATZ, na presença de compostos organofosforados tem aumento em seu efeito tóxico (XING et al., 2012).

Não observamos alterações na atividade de GST em *O. niloticus* nem em *G. brasiliensis*, no entanto, nessa última espécie a atividade dessa enzima tinha sido induzida pela mesotriona (capítulo I) nas concentrações 7 e 30  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , que são componentes das misturas MA 1 e MA 2, respectivamente. GST não se alterou no molusco *Corbicula fluminea* expostos nem a ATZ e roundup isolados, bem como a mistura dos dois compostos (SANTOS e MARTINEZ, 2014).

A SOD não teve alterações em relação ao controle em *O. niloticus*, mesmo resultado observado quando analisadas as substâncias isoladamente (capítulos I e II). Já em *G. brasiliensis*, observamos redução da atividade da enzima nos tratamentos MA 1 e MA 2. As concentrações de ATZ e mesotriona utilizadas em MA 1 não causaram qualquer mudança na atividade de SOD nessa espécie (capítulos I e II). Presente em MA 2, a concentração de 25  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de ATZ havia causado aumento significativo da atividade de SOD nessa espécie, enquanto que a concentração de 460  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de mesotriona, presente em MA 3 também havia causado aumento em sua atividade. No entanto, MA 3 não apresenta diferença em relação ao controle. Esses dados mostram que a interação entre os herbicidas pode estar diminuição na atividade de SOD em relação aos dois compostos isolados em *G. brasiliensis*. Santos e Martinez (2014) encontraram resultados similares

no molusco de água doce *Corbicula fluminea* expostos a atrazina, roundup, e a mistura dos dois. Os autores encontraram aumento da atividade da SOD em nos herbicidas quando isolados, mas o mesmo efeito não foi observado na mistura, onde não ocorreu diferença em relação ao controle. Os dados obtidos na espécie *G. brasiliensis* mostram que além de uma redução em relação aos compostos isolados, SOD ainda teve menor atividade em duas baixas concentrações dos herbicidas combinados. Xing et al (2012) analisaram a toxicidade do herbicidas atrazina e do inseticida clorpirifós, além de sua mistura em fígado e brânquias de carpas expostas por um período de 40 dias. Os autores encontraram redução na atividade de SOD nos pesticidas isolados e em mistura nas duas maiores concentrações testadas.

Outra enzima antioxidante, a GPx, apresentou resposta parecida com a SOD. *O. niloticus* expostas a mesotriona nas concentrações de 30 e 460  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de mesotriona haviam tido maior atividade (capítulo II). No entanto, nenhum tratamento com a mistura apresentou diferença significativa na atividade dessa enzima. Em *G. brasiliensis*, a atrazina havia induzido aumento da atividade de GPx na concentração de 400  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (capítulo I). No entanto, nessa espécie também não foi observado alterações na atividade da glutathione peroxidase. Esta diminuição da atividade da GPx foi observada na mistura entre roundup e atrazina em *Corbicula flumínea* (SANTOS e MARTINEZ, 2014).

Em *G. brasiliensis*, MA 3 causou diminuição significativa na concentração de GSH, diferentemente do que ocorreu com os tratamentos com os compostos isolados (capítulos I e II), onde não ocorreu diferenças em relação ao controle. Já em *O. niloticus*, não observamos diferenças entre controle e os três tratamentos com as misturas. No entanto, todas as concentrações testadas da atrazina (capitulo I) haviam causado diminuição significativa na concentração de GSH, e os tratamentos 7  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (MA 2) e 460  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (MA 3) de mesotriona causaram aumento significativo da glutathione reduzida

nessa espécie. Resultado similar foi observado por XING e colaboradores (2012), que encontraram diminuição da concentração de GSH pela atrazina e clorpirifós isoladamente, e quando misturados, apenas o tratamento contendo os pesticidas nas maiores concentrações apresentaram redução significativa da GSH.

O esgotamento do conteúdo celular de GSH abaixo de níveis críticos impede a conjugação de xenobióticos, como atrazina, a GSH permitindo que estes se combinem com outras macromoléculas (VAN DER OOST et al., 2003). Tal fato pode ser observado em *O. niloticus* expostas a atrazina nas concentrações de 1,5 e 6,25  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , onde além da diminuição do conteúdo de GSH, também ocorreu aumento na LPO (capítulo I). Nessas concentrações, quando combinada com a mesotriona, não foi observado redução da GSH e nem aumento em danos a lipídios em *O. niloticus*. Em relação as proteínas, não foi observado aumento da PCO nos experimentos com atrazina (capítulo I) e mesotriona (capítulo II) isolados, bem como em suas misturas em todos os tratamentos para ambas as espécies, demonstrando assim que PCO pode não ser um bom biomarcador para este tipo de pesticida quando utiliza-se peixes como organismo teste.

O ensaio cometa foi o biomarcador que nos deu uma melhor resolução dos efeitos que a mistura pode estar causando nos peixes. Em *O. niloticus*, os grupos MT 1 nos eritrócitos e MT 2 no fígado e brânquias apresentaram diferenças significativas em relação aos controles. Em *G. brasiliensis*, no grupo MA 1 no fígado esse resultado também foi observado. No entanto, as concentrações isoladas dos herbicidas utilizadas nesses tratamentos não haviam causado efeitos genotóxicos nos peixes expostos. Esses dados mostram que está ocorrendo sinergismo entre os xenobióticos, causando genotoxicidade em concentrações antes não danosas. Santos e Martinez (2014) encontraram efeitos sinérgicos dos herbicidas roundup e atrazina em *Corbicula flumínea*. Esses herbicidas não se mostraram genotóxicos aos moluscos nas concentrações de 2 e

10, no entanto a combinação deles, tanto na menor quanto na maior concentração, fizeram os danos ao DNA de hemócitos aumentassem significativamente.

Nas maiores concentrações dos herbicidas combinados (MT 3 e MA 3) aconteceu o efeito oposto, o antagonismo. Nas concentrações mais altas, os herbicidas causaram efeitos genotóxicos acentuados as duas espécies, com exceção à mesotriona nas brânquias de *G. brasiliensis* (capítulo II). Tal efeito de antagonismo foi observado no fígado e brânquias em MT 3, e em *G. brasiliensis* apenas nos eritrócitos dos indivíduos submetidos a mistura MA 3. A ATZ, assim como outros herbicidas do grupo das triazinas, podem se intercalar diretamente no DNA, formando aductos entre as bases adenina e guanina (OLIVEIRA-BRETT e SILVA, 2002). A formação de aductos com o DNA também é responsável pela genotoxicidade de outros herbicidas, como o glifosato (PELUSO et al., 1998). Alguns estudos relatam que a ATZ apresenta interação sinérgica com alguns inseticidas (BELDEN e LYDY, 2000; LYDY e AUSTIN, 2004; SCHULER et al., 2005), podendo aumentar a permeabilidade destes (SANTOS e MARTINEZ, 2014). Infelizmente não está claro se a mesotriona age diretamente no DNA. Os resultados obtidos no capítulo II indicam que esse composto gera ERO, portanto, não podemos afirmar com clareza se os danos ao DNA relatados naquele capítulo são gerados por contato direto com o material genético.

Eritrócitos em MT 3, além de apresentar elevados danos ao DNA, foi o único tratamento em *O. niloticus* que apresentou frequência de AMN e MN superiores ao grupo controle. Em *G. brasiliensis* ocorreu aumento de AMN em todos os tratamentos, no entanto, aumento na frequência de micronúcleos ocorreu apenas em MA 2 e MA 3. Nessa última espécie, não ocorreu alterações na quantidade de eritrócitos jovens em relação aos controles. Já em *O. niloticus* ocorreu diminuição no número de eritrócitos policromáticos em MT 2 e MT 3. Avaliação da citotoxicidade a eritropoiese tem um importante papel na



avaliação de xenobióticos, sendo a contagem de eritrócitos imaturos (PCE) no sangue periférico o método mais popular e convencional na avaliação da eritropoiese. Diminuição na proporção de PCE é considerado um indicador de indução a mutagenicidade e citotoxicidade (CAVAŞ; ERGENE-GÖZÜKARA, 2005). Nossos resultados em *O. niloticus* apontam redução de PCE nos peixes expostos aos tratamentos MT 2 e 3, indicando que essas misturas podem ter efeitos mutagênicos e citotóxicos aos organismos expostos a elas.

## CONCLUSÕES

Nossos resultados mostram que a mistura entre ATZ e mesotriona causou poucas alterações de resposta ao estresse oxidativo, no entanto, a combinação desses herbicidas levou a danos ao material genético de ambas as espécies em concentrações que quando isoladas não causam tal efeito. O aumento da frequência de AMN e MN mostra que essa combinação é potencialmente citotóxica, e em *O. niloticus* reduz a renovação dos eritrócitos circulantes.

O modo como foram feitas as misturas dos herbicidas, baseado em concentrações dos compostos isolados que não causavam efeitos adversos e concentrações mínimas que causavam efeitos adversos, além de uma mistura em concentrações superiores, se mostrou eficiente, nos permitindo visualizar diferentes tipos de interações entre os pesticidas.

Mais estudos são necessários para entendermos melhor como ocorre, e quais os resultados dessa interação aos organismos não alvo dos herbicidas.

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse estudo apresentou dados relevantes a respeito de respostas de biomarcadores bioquímicos e genéticos em duas espécies de peixes expostos a dois herbicidas extensamente utilizados no mundo, a ATZ e a mesotriona, além da mistura dos mesmos. Os biomarcadores utilizados tiveram enfoque na resposta bioquímica ao estresse oxidativo, através da quantificação da resposta das enzimas SOD, GST e GPx, além da quantificação da GSH intracelular. A fim de verificar se tais herbicidas causavam danos a macromoléculas, direta ou indiretamente, utilizamos biomarcadores para danos ao DNA (ensaio cometa em eritrócitos, fígado e brânquias), lipídeos (LPO) e proteínas (PCO) em *O. niloticus* e *G. brasiliensis*.

As duas espécies testadas responderam de forma diferente à ATZ. *G. brasiliensis* apresentou níveis basais de estresse oxidativo e quebras ao DNA maiores do que *O. niloticus*. Os *G. brasiliensis* parecem sofrer danos mais severos ao material genético causados pela atrazina nas concentrações de 25 e 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .

O modo de combater ERO gerado pela ATZ foi diferente entre as espécies, enquanto que em *O. niloticus*, a GSH teve um grande decréscimo em todos os tratamentos, provavelmente devido a ligação com a ATZ. A SOD (aumentada nos grupos 25 e 400  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) parece ser a principal enzima envolvida na eliminação de radicais livres. Em *G. brasiliensis*, onde não ocorre redução da GSH, a GPx também está envolvida no processo de eliminação de ERO, notadamente nos dois tratamentos com as maiores concentrações de ATZ.

O *O. niloticus* parece ser a espécie mais adequada em bioensaios utilizando biomarcadores bioquímicos e genéticos, pois nessa espécie é possível observarmos alterações causadas pelo xenobióticos em concentrações mais baixas, devido ao seu menor nível basal de danos ao material genético e concentração das enzimas analisadas.

Nossos dados são pioneiros na utilização de biomarcadores em peixes para testar possíveis efeitos adversos da mesotriona. O herbicida foi genotóxico em concentrações muito inferiores às concentrações de aplicação em campo, além de ter induzido a resposta de enzimas responsáveis pela eliminação do estresse oxidativo. Indução essa que não foi suficiente para impedir a geração de danos oxidativos às membranas lipídicas.

Mesotriona não causou efeitos adversos na concentração em que é carregada para os corpos d'água pela chuva. No entanto, sabe-se que um dos produtos de degradação da mesotriona no solo e água apresentou maior toxicidade do que o próprio herbicida em *V. fischeri*, além de que o produto formulado utilizado no campo é mais tóxico do que o princípio ativo testado em nosso trabalho. Esses dados sugerem que deve-se ter cautela no uso desse herbicida. Dessa forma, para que se tenha um conhecimento mais amplo do real potencial de contaminação da mesotriona ao meio ambiente, faz-se necessário mais testes de toxicidade desse princípio ativo, de seus metabólitos, bem como do produto formulado comercial.

A mistura entre ATZ e mesotriona causou poucas alterações de resposta ao estresse oxidativo, no entanto, a combinação desses herbicidas levou a danos ao DNA de ambas as espécies em concentrações que quando isoladas não causam tal alteração. Esse efeito sinérgico foi observado na mistura de concentrações baixas dos compostos, enquanto que na mistura de concentrações maiores o efeito foi antagônico. Ou seja, nas maiores concentrações dos xenobióticos isolados foi observado aumento de danos ao DNA, no entanto, quando combinados esse efeito genotóxico não ocorreu. Observamos também aumento na frequência de AMN e MN, o que indica que essa combinação é potencialmente citotóxica, além de reduzir a renovação dos eritrócitos circulantes em *O. niloticus*.

De modo geral, nossos dados mostram que as espécies testadas respondem de forma similar à ATZ, no entanto possuem níveis basais e danos à macromoléculas e concentrações de enzimas diferentes. Além disso, fornecemos dados inéditos a respeito da toxicidade da mesotriona e da mistura deste composto com a ATZ. O modo como foram preparadas as misturas dos herbicidas, baseado em concentrações dos compostos isolados que não causavam efeitos adversos e concentrações mínimas que causavam efeitos adversos, além de uma mistura em concentrações superiores, se mostrou eficiente, podendo ser aplicado em outras espécies, e também em bioensaios com misturas dos mais diversos compostos.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL, A.; PANDEY, R. S.; SHARMA, B. Water pollution with special reference to pesticide contamination in India. **Journal of Water Resource and Protection**, v. 2, p. 432-448, 2010.
- ALFERNESS, P.; WIEBE, L. Determination of mesotrione residues and metabolites in crops, soil, and water by liquid chromatography with fluorescence detection. **J Agric Food Chem** 50:3926– 3934, 2002.
- AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation research**, v. 343, n. 2-3, p. 121–35, 1995.
- AMORIM, F. S.; LOUVANDINI, H.; GRISOLIA, C. K.; AGRICULTURA, E. S. DE. Lack of genotoxicity in *Astyanax bimaculatus* and *Oreochromis niloticus* of 17 $\alpha$ -methyltestosterone used in fish hatcheries to produce male monosex populations. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 4, p. 5013–5022, 2013.
- AOYAMA, K.; IWAHORI, K.; MIYATA, N. Application of *Euglena gracilis* cells to comet assay: evaluation of DNA damage and repair. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 538, n. 1-2, p. 155–162, 2003.
- ARMAS, E.D. et al. Diagnóstico espaço-temporal da ocorrência de herbicidas nas águas superficiais e sedimentos do rio Corumbataí e principais afluentes. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1119-1127, 2007.
- ARMSTRONG, R.N. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. **Chem. Res. Toxicol.**, v.10, p.2–18, 1997.
- ARTEEL, G.E.; SIES, H. The biochemistry of selenium and the glutathione system. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v.10, p.153-158, 2001.
- ATAMANIUK, T. M.; KUBRAK, O. I.; STOREY, K. B.; LUSHCHAK, V. I. Oxidative stress as a mechanism for toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D): Studies with goldfish gills. **Ecotoxicology**, v. 22, p. 1498–1508, 2013.
- ATEEQ, B.; FARAH, M. A.; AHMAD, W. Detection of DNA damage by alkaline single cell gel electrophoresis in 2,4-dichlorophenoxyacetic-acid- and butachlor-exposed erythrocytes of *Clarias batrachus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 62, p. 348–354, 2005.
- AZEVEDO, D. DE A.; GERCHON, E.; REIS, E. O. DOS. Monitoring of pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons in water from Paraíba do Sul River, Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 2, p. 292–299, 2004.
- AZQUETA, A.; SHAPOSHNIKOV, S.; COLLINS, A. R. DNA oxidation: investigating its key role in environmental mutagenesis with the comet assay. **Mutation research**, v. 674, n. 1-2, p. 101–8, 2009.

BANUDEVI, S.; KRISHNAMOORTHY, G.; VENKATATAMAN, P.; VIGNESH, C.; ARULDHAS, M.M.; ARUNAKARAN, J. Role of  $\alpha$ -tocopherol on antioxidant status in liver, lung and kidney of PCP exposed male albino rats. **Food Chem. Toxicol.**, 44, 2040–2046, 2006.

BARCHANSKA, H.; RUSEK, M.; SZATKOWSKA, A. New procedures for simultaneous determination of mesotrione and atrazine in water and soil. Comparison of the degradation processes of mesotrione and atrazine. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 184, p. 321–334, 2012.

BELDEN, J.B., LYDY, M.J. Impact of atrazine on organophosphate insecticide toxicity. **Environ. Toxicol. Chem.** 19, 2266–2274, 2000.

BELPAEME, K.; COOREMAN, K.; KIRSCH-VOLDERS, M. Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. **Mutation research**, v. 415, n. 3, p. 167–84, 1998.

BELPAEME, K.; DELBEKE, K.; ZHU, L.; KIRSCH-VOLDERS, M. Cytogenetic studies of PCB77 on brown trout (*Salmo trutta fario*) using the micronucleus test and the alkaline comet assay. **Mutagenesis**, v. 11, n. 5, p. 485–492, 1996.

BENINCÁ, C. **BIOMONITORAMENTO DAS LAGOAS ESTUARINAS DO CAMACHO – JAGUARUNA (SC) E SANTA MARTA - LAGUNA (SC); UTILIZANDO *Geophagus brasiliensis* (CICHLIDAE).**, 2006. Universidade Federal do Paraná.

BENINCÁ, C.; RAMSDORF, W.; VICARI, T.; et al. Chronic genetic damages in *Geophagus brasiliensis* exposed to anthropic impact in estuarine lakes at Santa Catarina coast--southern of Brazil. **Environmental monitoring and assessment**, v. 184, n. 4, p. 2045–56, 2012.

BLAHOVÁ, J.; PLHALOVÁ, L.; HOSTOVSKÝ, M.; et al. Oxidative stress responses in zebrafish *Danio rerio* after subchronic exposure to atrazine. **Food and Chemical Toxicology**, v. 61, p. 82–85, 2013.

BOLOGNESI, C. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 543, n. 3, p. 251–272, 2003.

BOMBAIL, V.; DENNIS, A.; GORDON, E.; BATTY, J. Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. **Chemosphere**, v. 44, n. 3, p. 383–392, 2001.

BONNET, J. L.; BONNEMOY, F.; DUSSER, M.; BOHATIER, J. Toxicity assessment of the herbicides sulcotrione and mesotrione toward two reference environmental microorganisms: *Tetrahymena pyriformis* and *Vibrio fischeri*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 55, p. 576–583, 2008.

BOPP, S. K.; ABICHT, H. K.; KNAUER, K. Copper-induced oxidative stress in rainbow trout gill cells. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 86, n. 2, p. 197–204, 2008.

BRASIL. Resolução do CONAMA de Nº 357, de 17 de Março de 2005 – Classificação dos Corpos de Água. , 2005. Brasília: Diário Oficial da República Federativa do Brasil.

BRODEUR, J. C.; POLISERPI, M. B.; D'ANDREA, M. F.; SÁNCHEZ, M. Synergy between glyphosate- and cypermethrin-based pesticides during acute exposures in tadpoles of the common South American Toad *Rhinella arenarum*. **Chemosphere**, v. 112, p. 70–76, 2014.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M. S. Assessment of the Piscine Micronucleus Test as an in situ Biological indicator of Chemical Contaminant Effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 1990.

CAVAS, T. In vivo genotoxicity evaluation of atrazine and atrazine-based herbicide on fish *Carassius auratus* using the micronucleus test and the comet assay. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 49, n. 6, p. 1431–5, 2011. Elsevier Ltd.

CAVAŞ, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Genotoxicity evaluation of metronidazole using the piscine micronucleus test by acridine orange fluorescent staining. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 19, n. 1, p. 107–111, 2005.

CHANG, L.W., TOTH, G.P., GORDON, D.A., GRAHAM, D.W., MEIER, J.R., KNAPP, C.W., DENOYELLES, F.J., CAMPBELL, S., LATTIER, D.L. Responses of molecular indicators of exposure in mesocosms: common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to the herbicides alachlor and atrazine. **Environ. Toxicol. Chem.** 24, 190–197, 2005.

CESTARI, M. M.; LEMOS, P. M. M.; RIBEIRO, C. A. D. O.; et al. Genetic damage induced by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by the comet assay and chromosomal aberrations. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 2, p. 270–274, 2004.

COLLINS, A. R.; DOBSON, V. L.; DUSINSKÁ, M.; KENNEDY, G.; STĚTINA, R. The comet assay: what can it really tell us? **Mutation research**, v. 375, n. 2, p. 183–93, 1997.

COTELLE, S.; FÉRARD, J. F. Comet assay in genetic ecotoxicology: a review. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 34, n. 4, p. 246–55, 1999.

COVA, D.; L. ROSSINI; P. NATALI; M. TREVISAN; A. A. M. DELRE. Assessment of the toxicological risk of pesticides and its correlation to the physicochemical characteristics and tissue distribution. **Agriculture Ecosystems & Environment**, 27: 531-537, 1989.

COX, C. ATRAZINE : TOXICOLOGY. **JOURNAL OF PESTICIDE REFORM**, v. 21, n. 2, p. 12–20, 2001.

CROUZET, O.; BATHISSON, I.; BESSE-HOGGAN, P.; et al. Response of soil microbial communities to the herbicide mesotrione: A dose-effect microcosm approach. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, p. 193–202, 2010.

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

DIXON, D. P.; LAPTHORN, A. Plant glutathione transferases. **Genome Biol.** 3: 1-10. 2002.

DURAND, S.; AMATO, P.; SANCELME, M.; DELORT, A.M.; COMBOURIEU, B.; BESSE-HOGAN, P. First isolation and characterization of a bacterial strain that biotransforms the herbicide mesotrione. **Lett Appl Microbiol** 43:222–228, 2006a.

DURAND, S.; LE GERET, B.; MARTIN, A.S.; SANCELME, M.; DELORT, A.M.; BESSE-HOGAN, P.; COMBOURIEU, B. Biotransformation of the triketone herbicide mesotrione by a Bacillus strain. Metabolite profiling using liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Commun Mass Spectrom** 20:2603–2613, 2006b.

EGAAS, E.; SKAARE, J.U.; SVENDSEN, N.O.; SANDVIK, M.; FALLS, J.G.; DAUTER-MAN, W.C.; COLLIER, T.K.; NETLAND, J. A comparative study of effects of atrazine on xenobiotic-metabolizing enzymes in fish and insect, and of the in-vitro phase-II atrazine metabolism in some fish, insects, mammals and one plant-species. **Comp Bio-chem Phys C** 106:141–149, 1993.

ELIA, A.C.; WALLER, W.T.; NORTON, S.J. Biochemical responses of Bluegill Sunfish (*Lepomis macrochirus*, Rafinesque) to atrazine induced oxidative stress. **Bull Environ Contam Toxicol** 68:809–816, 2002.

ERBE, M. C. L.; RAMSDORF, W. A.; VICARI, T.; CESTARI, M. M. Toxicity evaluation of water samples collected near a hospital waste landfill through bioassays of genotoxicity piscine micronucleus test and comet assay in fish *Astyanax* and ecotoxicity *Vibrio fischeri* and *Daphnia magna*. **Ecotoxicology (London, England)**, 2010.

ERGENE, S.; CAVAŞ, T.; CELIK, A.; KÖLELI, N.; AYMAK, C. Evaluation of river water genotoxicity using the piscine micronucleus test. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 48, n. 6, p. 421–9, 2007.

FATIMA, M., AHMAD, I., SAYEED, I., ATHAR, M., RAISUDDIN, S. Pollutant-induced over-activation of phagocytes is concomitantly associated with peroxidative damage in fish tissues. **Aquat. Toxicol.** 49, 243–250, 2000.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation research**, v. 455, n. 1-2, p. 81–95, 2000.

FERRARO, M. V. M. **Avaliação de três espécies de peixe – *Rhamdia quelen*, *Cyprinus carpio* e *Astyanax bimaculatus*, como potenciais Bioindicadores em sistemas hídricos através dos ensaios: cometa e dos micronúcleos**, 2009. Universidade Federal do Paraná.

FERRARO, M. V. M.; FENOCCHIO, A. S.; MANTOVANI, M. S.; RIBEIRO, C. D. O.; CESTARI, M. M. 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**, v. 27, n. 1, p. 103–107, 2004.

FERREIRA, M.; MORADAS-FERREIRA, P.; REIS-HENRIQUE, M.A. Oxidative stress biomarkers in two resident species, mullet (*Mugil cephalus*) and flounder (*Platichthys flesus*), from a polluted site in River Douro Estuary, Portugal. **Aquat Toxicol** 71:39–48, 2005.

FREITAS, L. G.; GÖTZ, C. W.; RUFF, M.; SINGER, H. P.; MÜLLER, S. R. Quantification of the new triketone herbicides, sulcotrione and mesotrione, and other important herbicides and metabolites, at the ng/l level in surface waters using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1028, n. 2, p. 277–286, 2004.

GAO, R.; YUAN, Z.; ZHAO, Z.; GAO, X. Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 45, n. 1, p. 41–45, 1998.

GHISI, N. D. C.; CESTARI, M. M. Genotoxic effects of the herbicide Roundup® in the fish *Corydoras paleatus* (Jenyns 1842) after short-term, environmentally low concentration exposure. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 185, p. 3201–3207, 2013.

GHISI, N. D. C.; RAMSDORF, W. A.; FERRARO, M. V. M.; et al. Evaluation of genotoxicity in *Rhamdia quelen* (Pisces, Siluriformes) after sub-chronic contamination with Fipronil. **Environmental monitoring and assessment**, v. 180, n. 1–4, p. 589–99, 2011.

GILLIOM, R.J., BARBASH, J.E., CRAWFORD, C.G., HAMILTON, P.A., MARTIN, J.D., NAKAGAKI, N., NOWELL, L.H., SCOTT, J.C., STACKELBERG, P.E., THELIN, G.P., WOLOCK, D.M. The quality of our nation's waters—pesticides in the nation's streams and ground water, 1992–2001. **US Geological Survey Circular** 1291, 2006.

GIROTTI, A. W. Introduction to serial reviews on regulatory and cytoprotective aspects of lipid hydroperoxide metabolism. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 2, p. 153, 2002.

GIROUX, I., PELLETIER, L. **Présence de pesticides dans l'eau au Québec: bilan dans quatre cours d'eau de zones en culture de maïs et de soya en 2008, 2009 et 2010**, Québec, ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs, Direction du suivi de l'état de l'environnement, 2012.

GLUSCZAK, L.; MIRON, D. D. S.; MORAES, B. S.; et al. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP**, v. 146, n. 4, p. 519–24, 2007.

- GONZÁLEZ, M.; SOLONESKI, S.; REIGOSA, M. A.; LARRAMENDY, M. L. Genotoxicity of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic and a commercial formulation, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid dimethylamine salt. I. Evaluation of DNA damage and cytogenetic endpoints in Chinese Hamster ovary (CHO) cells. **Toxicology in Vitro**, v. 19, p. 289–297, 2005.
- GRAYMORE, M., STAGNITTI, F., ALLINSON, G. Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. **Environ. Intern.** 26, 483-495, 2001..
- GRISOLIA, C. K. **Agrotóxicos Mutações, Câncer e Reprodução**. Editora da UNB. Brasília, 392 p, 2005.
- GUL, S.; BELGE-KURUTAS, E.; YILDIZ, E.; SAHAN, A.I.; DORAN, F. Pollution correlated modifications of liver antioxidant systems and histopathology of fish (Cyprinidae) living in Seyhan Dam Lake, Turkey. **Environment International**, v. 30, n. 5, p. 605-609, 2004.
- GUSTAVINO, B.; SCORNAJENGI, K. A; MINISSI, S.; CICCOTTI, E. Micronuclei induced in erythrocytes of *Cyprinus carpio* (teleostei, pisces) by X-rays and colchicine. **Mutation research**, v. 494, n. 1-2, p. 151–9, 2001.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death. **Free Radicals in Biology and Medicine**, v. 4, 2007.
- HAYES, M.A.; TIMMINS, A.C.; YAU, E.H.; PALAZZO, M.; WATSON, D.; HINDS, C. J. Oxygen transport patterns in patients with sepsis syndrome or septic shock: influence of treatment and relationship to outcome. **Critical Care Medicine**, v. 25, n. 6, p. 926-936, 1997.
- HAYES, T.; HASTON, K.; TSUI, M.; et al. Herbicides: feminization of male frogs in the wild. **Nature**, v. 419, n. 6910, p. 895–6, 2002.
- HEDDLE, J. A. A rapid in vivo test for chromosomal damage. **Mutation Research**, v. 18, n. 2, p. 187–190, 1973.
- HIGUCHI, Y. Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, n. 8, p. 1527- 1535, 2003.
- HUGGETT, R. J.; KIMERIE, R. A.; MEHRIE JR., P. M.; BERGMAN, H. L. **Biomarkers: biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1992.
- HUSSEIN, S. Y.; EL-NASSER, M. A; AHMED, S. M. Comparative studies on the effects of herbicide atrazine on freshwater fish *Oreochromis niloticus* and *Chrysichthyes auratus* at Assiut, Egypt. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 57, n. 3, p. 503–10, 1996.

IBGE – **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola – Abril / Maio 2009 - [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa\\_200905\\_3.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_200905_3.shtm).

JACOMINI, A. E. **Bioacumulação do herbicida atrazina pelas espécies de bivalves límnicos *Anodontides trapesialis* (Lamarck, 1819) e *Corbicula fluminea* (Müeller, 1774)**. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2002.

JAMES, I. K.; A. REHMAN; J. HICKING. Mesotrione, a new herbicide for weed control in maize. **New Zealand Plant protection**, 59: 242-249, 2006..

JHA, A. N. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 207–21, 2008.

JIANG, Z-Y.; HUNT, J.V.; WOLFF, S.P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Anal. Biochem.**, v.202, p.384- 389, 1992.

JIN, Y.; ZHANG, X.; SHU, L.; et al. Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposure in adult female zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 78, n. 7, p. 846–52, 2010.

JOHNSON, B. C.; YOUNG, B. G.; MATTHEWS, J. L. Effect of postemergence application rate and timing of mesotrione on corn (*Zea mays*) response and weed control. **Weed Technology**, Lawrence, v. 16, n. 2, p. 414-420, 2002.

JOLY, P.; BONNEMOY, F.; CHARVY, J. C.; BOHATIER, J.; MALLET, C. Toxicity assessment of the maize herbicides S-metolachlor, benoxacor, mesotrione and nicosulfuron, and their corresponding commercial formulations, alone and in mixtures, using the Microtox® test. **Chemosphere**, v. 93, n. 10, p. 2444–2450, 2013. Elsevier Ltd.

KEEN, J.H.; HABIG, W.H.; JAKOBY, W.B. Mechanism for several activities of the glutathione S- transferases. **J. Biol. Chem.**, v.251, p.6183-6188, 1976.

KELLY, J. R., HARWELL, M. A. Indicators of ecosystem response and recovery, 1989. In: ZAGATTO, P. A., BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática - Princípios e Aplicações**. RiMa Editora, São Carlos, 2006.

KLEMZ, C. **Uso de biomarcadores de contaminação ambiental em peixes *Ancistrus sp* (cascudo)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

KLIGERMAN, A. D.; DOERR, C. L.; TENNANT, A. H.; PENG, B. Cytogenetic studies of three triazine herbicides. II. In vivo micronucleus studies in mouse bone marrow. **Mutation research**, v. 471, n. 1-2, p. 107–12, 2000.

KREUTZ, L. C.; BARCELLOS, L. J. G.; SILVA, T. O.; et al. Acute toxicity test of agricultural pesticides on silver catfish (*Rhamdia quelen*) fingerlings. **Ciência Rural**, 2008.

KULLANDER, S.O. Cichlidae (Cichlids) In: **Checklist of the freshwater fishes of South and Central America**, Reis RE, Kullander SO, Ferraris Jr. CJ. Porto Alegre: EDIPUCRS, Brasil, 605–654, 2003.

LACKNER, R. “Oxidative stress” in fish by environmental pollutants. In: Braunbeck, T., Hinton, D.E., Streit, B. (Eds.), **Fish Ecotoxicology**. Birkhauser Verlag, Basel, pp. 203–224, 1998.

LIU, Y., WANG, J.S., WEI, Y.H., ZHANG, H.X., XU, M.Q., DAI, J.Y. Induction of time- dependent oxidative stress and related transcriptional effects of perfluorododecanoic acid in zebrafish liver. **Aquat. Toxicol.** 89, 242–250, 2008.

LIVINGSTONE, D.R. Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture. **Rev Med Vet** 154:427–430, 2003.

LOMAESTRO, B. M.; MALONE, M. Glutathione in health and disease: pharmacotherapeutic issues. **Ann. Pharmacother.** v. 29, p. 1263-1273. 1995.

LONDOÑO, D. K. **Biochemical and molecular effects of atrazine exposure in *Chironomus tentans* and *Pimephales promelas***, 2005. University of Nebraska.

LYDY, M.J.; AUSTIN, K.R. Toxicity assessment of pesticide mixtures typical of the Sacramento–San Joaquin delta using *Chironomus tentans*. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** 48, 49–55, 2004.

MARIONNET, D.; DESCHAUX, P.; REYNAUD, S. Possible implication of macrophages in the regulation of cytochrome P450 activities in carp (*Cyprinus carpio*). **Fish Shellfish Immunol.** 21: 80-91. 2006.

MARTÍNEZ-TABCHE, L.; MADRIGAL-BUJAJIDAR, E.; NEGRETE, T. Genotoxicity and lipoperoxidation produced by paraquat and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in the gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mikiss*). **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 73, n. August 2003, p. 146–152, 2004.

MATVIISHYN, T. M.; KUBRAK, O. I.; HUSAK, V. V.; STOREY, K. B.; LUSHCHAK, V. I. Tissue-specific induction of oxidative stress in goldfish by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid: Mild in brain and moderate in liver and kidney. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 37, n. 2, p. 861–869, 2014. Elsevier B.V.

McCARTHY, J.F.; SHUGART, L.R. **Biomarkers of environmental contamination**. Lewis, Boca Raton, USA, 1990.

MEISTER, A. Glutathione metabolism and its selective modification. **J. Biol. Chem.**, v.263, p.17205–17208, 1988.

MELA, M.; GUILOSKI, I. C.; DORIA, H. B.; RANDI, M. A F.; et al. Effects of the herbicide atrazine in neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 93, p. 13–21, 2013a.

- MELA, M.; GUILOSKI, I. C.; DORIA, H. B.; RABITTO, I. S.; et al. Risks of waterborne copper exposure to a cultivated freshwater Neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 88, p. 108–116, 2013b.
- MELA, M.; NETO, F. F.; YAMAMOTO, F. Y.; et al. Mercury distribution in target organs and biochemical responses after subchronic and trophic exposure to Neotropical fish *Hoplias malabaricus*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 245–256, 2014.
- MOORE, M. N.; DEPLEDGE, M. H.; READMAN, J. W.; PAUL LEONARD, D. R. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. **Mutation research**, v. 552, n. 1-2, p. 247–68, 2004.
- MORENO, N. C.; SOFIA, S. H.; MARTINEZ, C. B. R. Genotoxic effects of the herbicide Roundup Transorb® and its active ingredient glyphosate on the fish *Prochilodus lineatus*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 37, n. 1, p. 448–454, 2014. Elsevier B.V.
- MOURENTE, G.; DÍAZ-SALVAGO, E.; BELL, J.G.; TOCHER, D.R. Increased activities of hepatic antioxidant defence enzymes in juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fed dietary oxidised oil: attenuation by dietary vitamin E. **Aquaculture**, v. 214, n. 1, p. 343-361, 2002
- MUMTAZ, M. **Principles and Practice of Mixtures Toxicology**. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2010.
- NASCIMENTO, I. A.; PEREIRA, S. A.; LEITE, M. B. N. L. Biomarcadores como instrumentos preventivos de poluição. cap. 17, p. 413-432 In: ZAGATTO, P. A., BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática - Princípios e Aplicações**. RiMa Editora, São Carlos, 2006.
- NETO, F. F. **Avaliação da citotoxicidade de uma mistura complexa de pesticidas , MeHg e DDT em hepatócitos de *Hoplias malabaricus***, 2007. Universidade Federal do Paraná.
- NWANI, C. D.; LAKRA, W. S.; NAGPURE, N. S.; et al. Toxicity of the herbicide atrazine: Effects on lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in the freshwater fish *Channa Punctatus* (Bloch). **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, p. 3298–3312, 2010.
- NWANI, C. D.; NAGPURE, N. S.; KUMAR, R.; et al. 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**, v. 31, n. 2, p. 314–22, 2011.
- NWANI, C. D.; NAGPURE, N. S.; KUMAR, R.; KUSHWAHA, B.; KUMAR, P. Induction of micronuclei and nuclear lesions in *Channa punctatus* following exposure to carbosulfan , glyphosate and atrazine. , v. 0545, n. 4, p. 370–377, 2014.

- OLIVEIRA-BRETT, A.M.; SILVA, L.A. A DNA-electrochemical biosensor for screening environmental damage caused by s-triazine derivatives. **Anal. Bioanal. Chem.** 373, 717–723, 2002.
- OOST, R. VAN DER; BEYER, J.; VERMEULEN, N. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57–149, 2003.
- OSÓRIO, F. H. T.; SILVA, L. F. O.; PIANCINI, L. D. S.; et al. Water quality assessment of the Tubarão River through chemical analysis and biomarkers in the Neotropical fish *Geophagus brasiliensis*. **Environmental science and pollution research international**, 2013.
- PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 70, n. 1, p. 158-169, 1967.
- PAULINO, M. G.; SAKURAGUI, M. M.; FERNANDES, M. N. Effects of atrazine on the gill cells and ionic balance in a neotropical fish, *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**, v. 86, n. 1, p. 1–7, 2012a.
- PAULINO, M. G.; SOUZA, N. E. S.; FERNANDES, M. N. Subchronic exposure to atrazine induces biochemical and histopathological changes in the gills of a Neotropical freshwater fish, *Prochilodus lineatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 80, p. 6–13, 2012b.
- PEIXOTO, M.F. **Resíduos de sorgo e doses de imazamox no controle de plantas daninhas na soja sob plantio direto**. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.
- PELUSO, M.; MUNNIA, A.; BOLOGNESI, C.; PARODI, S. 32P-post-labeling detection of DNA adducts in mice treated with the herbicide Roundup. **Environ. Mol. Mutagen.** 31, 55–59, 1998.
- PEÑA-LLOPIS, S.; FERRANDO, M.D.; PEÑA, J.B. Fish tolerance to organophosphate- induced oxidative stress is dependent on the glutathione metabolism and enhanced by N-acetylcysteine. **Aquat. Toxicol.** 65, 337–360, 2003..
- PIANCINI, L. D. S. **UTILIZAÇÃO DE BIOMARCADORES GENÉTICOS NA AVALIAÇÃO AGUDA DO EFEITO MUTAGENICO DOS CONTAMINANTES ATRAZINA E CLORETO DE COBRE EM *Rhamdia quelen* ( Siluriformes , Heptapteridae )** CURITIBA, 2011. Universidade Federal do Paraná.
- QIAN, H.F.; SHENG, G.D.; LIU, W.P.; LU, Y.C.; LIU, Z.H.; FU, Z.W. Inhibitory effects of atrazine on *Chlorella vulgaris* as assessed by real-time polymerase chain reaction. **Environ. Toxicol. Chem.** 27, 182–187, 2008.
- RAMSDORF, W. A; GUIMARÃES, F. D. S. F.; FERRARO, M. V. M.; et al. Establishment of experimental conditions for preserving samples of fish blood for

analysis with both comet assay and flow cytometry. **Mutation research**, v. 673, n. 1, p. 78–81, 2009.

RICE, E. L. **Allelopathy**. 2 ed. New York: Academic Press, 422 p, 1984.

RIOL, M. J.; VALINAS, N.; PEREZ LOPEZ, M. Glutathione S-transferases from rainbow trout liver and freshly isolated hepatocytes: purification and characterization. **Comparative Biochemistry Physiology C**, v. 128, p. 227- 235, 2001.

ROSSI, S. C.; DREYER DA SILVA, M.; PIANCINI, L. D. S.; et al. Sublethal effects of waterborne herbicides in tropical freshwater fish. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 87, n. 6, p. 603–7, 2011.

SALABERRIA, I.; HANSEN, B. H.; ASENSIO, V.; et al. Effects of atrazine on hepatic metabolism and endocrine homeostasis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Toxicology and applied pharmacology**, v. 234, n. 1, p. 98–106, 2009.

SANTOS, K. C. DOS; MARTINEZ, C. B. R. Genotoxic and biochemical effects of atrazine and Roundup, alone and in combination, on the Asian clam *Corbicula fluminea*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 100, p. 7–14, 2014.

SANTOS, T. G.; MARTINEZ, C. B. R. Atrazine promotes biochemical changes and DNA damage in a Neotropical fish species. **Chemosphere**, v. 89, n. 9, p. 1118–1125, 2012.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, v. 31, p. 9–15, 1975.

SCHULER, L.; TRIMBLE, A.; BELDEN, J.; LYDY, M. Joint toxicity of triazine herbicides and organophosphate insecticides to the midge *Chironomus tentans*. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** 49, 173–177, 2005.

SCHWANTES, A.R.; BARTLETI, G.R.; SCHWANTES, M.L.B. The hemoglobin of *Geophagus brasiliensis* (Cichlidae). **Comp. Biochem. Physiol.** v. 998 p.157-160. 1991.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total protein bound and nonprotein sulphhydryl groups in tissues with Ellman's reagent. **Anal. Biochem.**, v.25, p.192-205, 1968.

SELIM H. Retention and run off losses of atrazine and metribuzin in soil. **J Environ Quality** 32:1058–1071, 2003.

SINDAG - **Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola**. <http://www.sindag.org.br/web/site/xhtml/content/home/default.aspx>. Acesso em 11 de Dezembro de 2012.

SK, H.U.; BHATTACHARYA, S. Prevention of cadmium induced lipid peroxidation, depletion of some antioxidative enzymes and glutathione by series of organoselenocyanates. **Environ. Toxicol. Pharmacol.** 22, 298–308, 2006.

SOLOMON, K. R.; BAKER, D. B.; RICHARDS, R. P. et al. Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 15, p. 31-74, 1996.

SOLOMON, K.R.; CARR, J.A.; DU PREEZ, L.H.; GIESY, J.P.; SMITH, E.E.; KENDALL, R.J.; VAN DER KRAAK, G.J. Effects of atrazine on fish, amphibians, and aquatic reptiles: a critical review. **Crit. Rev. Toxicol.** 38, 721–772, 2008.

SOUZA, T. S.; FONTANETTI, C. S. DNA damage of erythrocytes of fish *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae), after acute exposure to river water receiving effluent from an oil refinery. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 7, n. 2, p. 17–22, 2012.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The comet assay (single-cell gel test). A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 113, p. 203–12, 1999.

STEGEMAN, J.J., HAHN, M.E., Biochemistry and molecular biology of monooxygenase: current perspective on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. In: Malins, D.C., Ostrander, G.K. (Eds.), **Aquatic toxicology; Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives**. Lewis Publishers, CRC press, Boca Raton, pp. 87- 206, 1994. In: VAN DER OOST, R., BEYER, J., VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. v. 13 p. 57-149, 2003.

STEGEMAN, J.J., BROWER, M., DI GIULIO, R.T., FÓRLIN, L., FOWLER, B.A., SANDERS, B.M., VAN VELD, P.A. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: Huggett, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle Jr., P.P., Bergman, H.L. (Eds.), **Biomarkers biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress**. Lewis Publishers, Chelsea, Mi, USA, pp. 235–335, 1992.

SUTTON, P.; RICHARDS, C.; BUREN, L.; GLASGOW, L. Activity of mesotrione on resistant weeds in maize. **Pest management science**, v. 58, n. 9, p. 981–4, 2002.

TER HALLE, A.; RICHARD, C. Simulated solar irradiation of mesotrione in natural waters. **Environ Sci Technol** 40:3842– 3847, 2006.

TOMITA, R. Y.; BEYRUTH, Z. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. **Biologico**, v. 64, n. 2, p. 135–142, 2002.

UEDA, T.; HAYASHI, M.; OHTSUKA, Y.; et al. Preliminary study of the micronucleus test by acridine orange fluorescent staining compared with chromosomal aberration test using fish erythropoietic and embryonic cells. **Water Science and Technology**, v. 25, n. 11, p. 235–240, 1992.

UNIÃO EUROPÉIA concerning the non-inclusion of atrazine in Annex I to Council Directive 91/414/EEC and the withdrawal of authorisations for plant protection products containing this active substance. **Official Journal of the European Union** (2004/248/EC), 2004.



- VALIENTE MORO, C.; BRICHEUX, G.; PORTELLI, C.; BOHATIER, J. Comparative effects of the herbicides chlortoluron and mesotrione on freshwater microalgae. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 31, n. 4, p. 778–786, 2012.
- VAN BLADEREN, P.J. Glutathione conjugation as a bioactivation reaction. **Chem. Biol. Interact.**, v.129, p.61–76, 2000.
- VENTURA, B. DE C.; ANGELIS, D. D. F. DE; MARIN-MORALES, M. A. Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 90, n. 1, p. 42–51, 2008.
- VOIGT, C. L.; PINTO, C.; DORIA, H. B.; et al. Bioconcentration and bioaccumulation of metal in freshwater Neotropical fish *Geophagus brasiliensis*. *Environ Sci Pollut Res*, DOI: 10.1007/s11356-014-3967-4. 2014.
- WALKER, C. H.; HOPKIN, S. P.; SIBLY, R. M.; PEAKAL, D. B. Principles of ecotoxicology. Taylor and Francis. London. 1996.
- WAN, M. T.; BUDAY, C.; SCHROEDER, G.; KUO, J.; PASTERNAK, J. Toxicity to *Daphnia magna*, *Hyaella azteca*, *Oncorhynchus kisutch*, *Oncorhynchus mykiss*, *Oncorhynchus tshawytscha*, and *Rana catesbeiana* of atrazine, metolachlor, simazine, and their formulated products. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 76, n. 1, p. 52–8, 2006.
- WIEGAND, C.; KRAUSE, E.; STEINBERG, C.; PFLUGMACHER, S. Toxicokinetics of atrazine in embryos of the zebrafish (*Danio rerio*). **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 49, 199– 205, 2001.
- WILHELM FILHO, D.; TORRES, M.A.; TRIBESS, T.B.; PEDROSA, R.C.; SOARES, C.H.L. Influence of season and pollution on the antioxidant defenses of the cichlid fish acar ( *Geophagus brasiliensis* ). **Braz J Med Biol Res** 34:719–726, 2001.
- WONG, C. M.; CHEEMA, A. K.; ZHANG, L.; SUZUKI, Y. J. Protein Carbonylation as a Novel Mechanism in Redox Signaling. **Circ. Res.** v. 102, p. 310-318, 2008.
- XING, H.; HAN, Y.; LI, S.; et al. Alterations in mRNA expression of acetylcholinesterase in brain and muscle of common carp exposed to atrazine and chlorpyrifos. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 73, n. 7, p. 1666–70, 2010.
- XING, H.; LI, S.; WANG, Z.; et al. Oxidative stress response and histopathological changes due to atrazine and chlorpyrifos exposure in common carp. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 103, n. 1, p. 74–80, 2012.
- XING, H.; WANG, Z.; GAO, X.; CHEN, D.; WANG, L. Ecotoxicology and Environmental Safety Atrazine and chlorpyrifos exposure induces liver autophagic response in common carp. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 113, p. 52–58, 2015.

YAMAMOTO, F. Y. **EFEITOS DO 17 $\alpha$  - ETINILESTRADIOL EM *Geophagus brasiliensis* E EXPRESSÃO DA VITELOGENINA COMO UM BIOMARCADOR DE DESREGULAÇÃO ENDÓCRINA EM PEIXES**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná, 2011.

YAMANO, T.; MORITA, S. Effects of pesticides on isolated hepatocytes, mitochondria and microsomes 11. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** 28, 1–7, 1995.

ZAGONEL, J.; FERNANDES, E. C. Controle de plantas daninhas e seletividade do herbicida tembotrione na cultura do milho. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 6, p. 42–49, 2007.

ZHU, L.; DONG, X.; XIE, H.; et al. DNA damage and effects on glutathione-S-transferase activity induced by atrazine exposure in zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental toxicology**, v. 26, n. 5, p. 480–8, 2011.

## 6. ANEXOS

### MÉTODOS

#### *BIOMARCADORES GENÉTICOS*

##### *Teste do Micronúcleo Písceo com coloração fluorescente de laranja de acridina*

A laranja de acridina cora seletivamente eritrócitos imaturos ou policromáticos (PCEs). 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.

Foi empregada a técnica descrita por UEADA et al., 1992 e ÇAVAS; ERGENE-GÖZÜKARA (2005), constituído pelas seguintes etapas:

- Foi coletado o sangue periférico;
- O sangue foi diluído em 200 µL de soro bovino fetal;
- Foi feito um esfregaço em lâminas limpas com essa suspensão celular;
- As lâminas secaram “overnight”;
- As lâminas foram fixadas em metanol por 10 minutos;
- As lâminas foram então coradas com laranja de acridina a 0.003% em tampão Sorenson’s com pH 6.8 por 2–3 minutos.
- As lâminas foram enxaguadas brevemente com o tampão.
- Foram analisados 2.000 eritrócitos por animal em microscópio de epifluorescência. Foram consideradas somente hemácias nucleadas com membranas nuclear e citoplasmática intacta. As alterações na forma elíptica normal dos núcleos das

hemácias que não se enquadrarem no conceito de micronúcleo, mas que poderiam ser descritas como alterações morfológicas nucleares também foram analisadas segundo CARRASCO, TILBURY e MYERS (1990).

#### *Ensaio Cometa*

Foi utilizada a técnica descrita por SPEIT e HARTMANN (1999), com alterações conforme FERRARO et al (2004) e CESTARI et al (2004) e para tecidos segundo RAMSDORF et al (2009).

#### *Ensaio cometa com eritrócitos*

##### *Procedimento utilizado para a montagem e análise das lâminas:*

- Foram coletados 10  $\mu$ L de sangue de cada animal e misturados com 1 mL de soro bovino fetal. Desta solução, coletou-se 10  $\mu$ L de suspensão celular que foram misturadas com 120  $\mu$ L de agarose LMP, previamente preparada e levemente aquecida (37°C).
- Colocou-se essa mistura sobre uma lâmina previamente coberta com agarose normal.
- Cobriu-se a lâmina com uma lamínula, que então foi levada a geladeira por 15 minutos.
- Depois de decorrido o tempo de refrigeração, retirou-se delicadamente as lamínulas.
- As lâminas foram colocadas em solução de lise dentro de cubetas de acrílico (completamente envoltas em papel alumínio de modo a evitar ao máximo o contato com a luz), e mantidas em refrigerador por 120 horas,

- Após esse tempo, foi preparada a cuba de eletroforese mergulhando-a em gelo (4°C) em ambiente escuro.

- As lâminas foram retiradas das cubetas onde estavam na solução de lise e foram colocadas na cuba horizontal de eletroforese. Quando necessário, os espaços vazios na cuba foram preenchidos com lâminas limpas.

- Na cuba de eletroforese, adicionou-se suavemente o tampão de eletroforese com pH maior que 13, de maneira a cobrir as lâminas.

- As lâminas foram mantidas na solução de eletroforese por 30 minutos para a desespiralização do DNA.

- Iniciou-se a corrida de eletroforese a 25 V e 300 mA por 25 minutos.

- Terminada a eletroforese as lâminas foram retiradas cuidadosamente da cuba e então tiveram seu pH neutralizado com 5 mL de tampão de neutralização (pH 7,5) por 5 minutos.

- Repetiu-se o banho de neutralização por mais duas vezes.

- As lâminas foram deixadas em posição inclinada para secagem, e após isso foram fixadas com etanol absoluto por 5 minutos.

- As lâminas foram estocadas até o momento da análise, quando foram coradas com 15 µL de brometo de etídeo, cobertas com lamínula e levadas a análise.

- A análise foi feita em microscópio de epifluorescência com aumento de 400x em teste cego, 100 nucleóides por lâmina.

- Os nucleóides foram classificados de acordo com o dano, conforme o comprimento da cauda formada após a eletroforese. Os nucleóides foram classificados em 4 classes distintas: 0 (sem dano aparente), 1 (dano pequeno), 2 (dano médio), 3 (dano grande) e 4 (dano máximo).

- Os escores foram calculados através da multiplicação do número de nucleóides encontrados em cada classe pelo valor da classe, como mostrado na fórmula a seguir:

$$\text{Escore} = [(0 \times \text{n}^\circ \text{ dano } 0) + (1 \times \text{n}^\circ \text{ dano } 1) + (2 \times \text{n}^\circ \text{ dano } 2) + (3 \times \text{n}^\circ \text{ dano } 3) + (4 \times \text{n}^\circ \text{ dano } 4)]$$

#### *Ensaio cometa com hepatócitos*

O procedimento para montagem das lâminas com o tecido hepático foi de acordo com as seguintes etapas:

- Foi retirado o fígado de cada animal, colocado em uma placa de petri e então uma pequena porção foi separada para a realização do ensaio cometa.

- O tecido foi acondicionado em microtubos tipo eppendorf contendo 1mL de soro bovino fetal. Esses microtubos foram armazenados sob refrigeração e na ausência de luz.

- O tecido foi desagregado a ~15.000 rpm por cerca de 30 segundos, com o auxílio de um homogeneizador Tecnal – TE-103.

- Coletou-se 10 µL do homogeneizado obtido, que foi misturado com 120 µl de agarose LMP, previamente preparada e levemente aquecida (37°C).

- As lâminas foram montadas de acordo com o protocolo já descrito para células sanguíneas.

#### *Ensaio cometa com células das brânquias*

O procedimento para montagem das lâminas com células da brânquia consistem das seguintes etapas:

- Foi retirado, do lado direito do peixe, o terceiro arco branquial de cada animal.

- Com o auxílio de um bisturi, as lamelas foram separadas do arco e lavadas com PBS para se retirar o máximo possível de sangue da amostra.

- O tecido foi acondicionado em microtubos tipo eppendorf contendo 1mL de soro bovino fetal. Esses microtubos foram armazenados sob refrigeração e na ausência de luz.

- O tecido foi desagregado a ~15.000 rpm por cerca de 30 segundos, com o auxílio de um homogenizador Tecnal – TE-103.

- Coletou-se 10  $\mu$ L do homogeneizado obtido, que foi misturado com 120  $\mu$ l de agarose LMP, previamente preparada e levemente aquecida (37°C).

- As lâminas foram montada de acordo com o protocolo já descrito para células sanguíneas.

## *PREPARAÇÕES PRÉVIAS DO ENSAIO COMETA*

Antes da coleta do material para análise, foram preparadas as lâminas com cobertura de agarose, a agarose de baixo ponto de fusão (LMP) e todos os reagentes necessários, segundo as etapas descritas a seguir:

### *Preparação das lâminas com cobertura de agarose*

- a) Foi dissolvido 1,5 g de agarose normal em 100 ml de PBS em Erlenmeyer, com agitação por duas horas.
- b) Solução foi colocada para aquecer em agitador magnético com aquecimento.
- c) Após fervura, a agarose solidificou a temperatura ambiente.
- d) A agarose foi picada em pedaços e colocada novamente para ferver.
- e) As etapas “c” e “d” foram repetidas mais uma vez.
- f) A solução foi colocada em banho-maria a 70°C.
- g) As lâminas, previamente limpas com etanol, foram mergulhadas na agarose até alcançar a parte esmerilhada, fazendo uma camada fina de agarose.
- h) As lâminas foram retiradas da agarose e limpas com papel no lado oposto da parte esmerilhada.
- i) As lâminas secaram “overnight” em temperatura ambiente na horizontal e depois estocadas.

### *Preparação da agarose de baixo ponto de fusão (LMP)*



- Foi dissolvido 0,1 g de agarose de baixo ponto de fusão em 20 ml de PBS.
- A solução foi colocada para aquecer com agitação constante.
- Ao levantar fervura, o aquecedor foi desligado e manteve-se a agitação até diminuir a temperatura da agarose.
- Foi desligado o agitador, deixando a agarose solidificar a temperatura ambiente.
- A solução foi mantida em geladeira até o momento do uso.

### *PREPARAÇÃO DOS REAGENTES*

#### *Solução de Lise – Estoque*

Para 1000 mL de solução estoque:

890 mL de água destilada ou milique ou deionizada.

146,1 g de Cloreto de Sódio - NaCl (2,5 M).

37,2 g de Acido Etilenodiaminotetracético - EDTA (100 mM; PM 372,24).

1,2 g TRIS 10 mM (PM 121,14).

8 g de Hidróxido de Sódio sólido (NaOH PM 40,0).

- Dissolver os reagentes em 890 mL de água.
- Acertar o pH com NaOH até atingir pH 10.
- Adicionar 10 g de Lauril Sarcosinato de Sódio e misturar bem lentamente para evitar a formação de grumos.

### *Solução de Lise – Uso*

Para 100 mL de solução de uso:

1 mL de Triton X – 100.

10 mL DMSO.

89 mL solução estoque.

- Adicionar todos os reagentes em uma proveta de 100 mL;
- Fazer e manter sempre no escuro.

### *Tampão de Eletroforese*

Solução de NaOH (300 mM):

19,2 g de NaOH.

48 mL de água deionizada.

a) Agitar.

### *Solução Estoque de Acido Etilenodiaminotetracético - EDTA (200 Mm)*

14,89 mL de EDTA.

200 mL de água deionizada.

- Acertar o pH para 10 com pastilhas de NaOH.
- A solução pode ser estocada.

Solução de uso:

1600 mL de água deionizada gelada (4°C).

8 mL de EDTA (200 Mm).

48 mL da solução de NaOH.

- Acertar o pH para maior 13 com pastilhas de NaOH.

*Tampão de Neutralização*

51,04 g de TRIS.

1000 mL de água deionizada.

- Acertar o pH para 7,5 com Acido clorídrico (HCL).

*Solução de Coloração – Estoque*

10 mg de Brometo de Etídio.

50 mL de água deionizada.

*Solução de Coloração – Uso*

1 mL de solução estoque.

9 mL de água deionizada.

*PBS*

0,2 g de Cloreto de potássio – KCl (PM 74,55).

0,2 g de Fosfato de potássio monobásico –  $\text{KH}_2\text{HPO}_4$  (PM 136,09).

8 g de Cloreto de sódio - NaCl (PM 58,44).

1,15 g de Hidrogênio-fosfato disódico anidro -  $\text{NaHPO}_4$  (PM 141,96).

1000 mL de água deionizada.

- Solução feita em balão volumétrico de 1000 mL.
- Foi acrescentado a água até alcançar a marca do balão volumétrico.
- O pH foi acertado para 7,4.
- A solução foi estocada em refrigerador.

## *BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS*

As amostras de fígado, foram descongeladas em gelo moído e pesados, sendo homogeneizados na proporção 1:10 (m/V) em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 com auxílio de micro-homogeneizador. O homogeneizado foi centrifugado por 30 minutos a 15.000 x g a 4°C, obtendo-se assim o sobrenadante, do qual foram retiradas alíquotas para medir a atividade da superóxido dismutase, glutatona peroxidase, glutatona S-transferase, a concentração de glutatona reduzida, a concentração de proteínas carboniladas e a lipoperoxidação.

### *Atividade da glutatona S-transferase (GST)*

O método foi proposto por Keen et al. (1976), e seu princípio é a conjugação do CDNB com a GSH pela ação da GST, formando um tioéter que pode ser monitorado pelo aumento da absorbância.

O sobrenadante foi diluído em tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 6,5. Em microplaca foram pipetados 20 µL de amostra, seguido de 180 µL da solução reação, composta por CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) 3,0 mM e GSH (glutatona reduzida) 3,0 mM. A leitura foi realizada em espectrofotômetro SYNERGY HT, a 340 nm e a atividade expressa em  $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mgproteína}^{-1}$ .

### *Atividade da superóxido dismutase (SOD)*

Para a análise da atividade da SOD foi utilizado o método proposto por Gao et al. (1998) e baseia-se na capacidade da SOD em inibir a auto-oxidação do pirogalol. O sobrenadante foi diluído de 1:10 (ou 10% V/V) em tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 7,0. Em um microtubo foram adicionados 885  $\mu$ L de tampão (Tris-base 1M / EDTA 5 mM pH 8,0) a 40  $\mu$ L de amostra. Após agitação em vórtex, 50  $\mu$ L de pirogalol 15 mM foram adicionados e a solução foi incubada por 30 minutos. A reação foi interrompida com 25  $\mu$ L de HCl 1N. Em microplaca foram adicionados 300  $\mu$ L por poço e a leitura foi realizada em espectrofotômetro SYNERGY HT a 440 nm. Foi realizado concomitantemente, um controle por amostra com adição dos reagentes, mas sem incubação sendo este valor igual a 100%. A quantidade de SOD que inibiu a reação em 50% (IC50) equivale a 1 unidade (U) de SOD. Os resultados foram expressos em U de SOD/mg de proteína.

### *Atividade da glutathiona peroxidase (GPx)*

A análise da atividade da GPx foi realizada através do método de Paglia e Valentine (1967) e baseia-se na medida do decréscimo de absorbância a 340 nm, promovido durante a redução da GSSG, catalisada pela glutathiona redutase (GR), em presença de NADPH. A velocidade de oxidação do NADPH é proporcional à velocidade de produção de GSSG a partir de GSH, em presença de peróxido, catalisada pela GPx. A atividade desta enzima foi mensurada utilizando-se 10  $\mu$ L do sobrenadante e 130  $\mu$ L do meio de reação (tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0; 2 mM de azida sódica; 0,2 mM de  $\beta$ - NADPH, 1,54 U/ml de GR e 2 mM de GSH). As amostras foram pipetadas em

microplaca e após 2 minutos, 60  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio (1,5 mM) foi adicionado. A leitura foi realizada em espectrofotômetro SYNERGY HT, a 340 nm e a atividade expressa em  $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mgproteína}^{-1}$ .

#### *Concentração de glutathiona reduzida (GSH)*

A análise da concentração de GSH baseou-se no método proposto por Sedlak e Lindsay (1968). A cada 200  $\mu\text{L}$  de sobrenadante foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético (TCA) a 50% para precipitação proteica. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 10.000 x g por 10 min a 4°C. Para as leituras, foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  do sobrenadante da amostra e 230  $\mu\text{L}$  de tampão (Tris-base 400 mM, pH 8,9) a uma microplaca. Como branco, será utilizado 230  $\mu\text{L}$  do tampão Tris-base a 400 mM mais 50  $\mu\text{L}$  de TCA a 10%. Finalmente, 20  $\mu\text{L}$  de DTNB (ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico) 2,5 mM (em metanol a 25%, tampão Tris-base 400 mM, pH 8,9) foram acrescentados. A leitura foi realizada a 415 nm em espectrofotômetro SYNERGY HT. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol GSH}\cdot\text{mgproteína}^{-1}$ . A determinação da concentração de GSH foi realizada por comparação com uma curva-padrão de GSH (0; 8,14; 16,27; 32,54; 65,08; 130,16 e 260,32  $\mu\text{M}$  GSH).

#### *Lipoperoxidação (LPO)*

A análise da LPO foi realizada através da avaliação da concentração de hidroperóxidos pelo ensaio FOX (Ferrous Oxidation / Xylenol Orange Method), proposto por Jiang et al. (1992).

O sobrenadante das amostras foi ressuspendido em metanol na proporção 1:2 (v/v) e centrifugado 10 minutos a 10.000 x g a 4°C. Em seguida 100 µL do sobrenadante foi pipetado em microtubos e incubado com 900 µL da solução reação (laranja de xilenol 100 µM, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 25 mM, BHT 4 µM, sulfato ferroso amoniacal 250 µM, metanol 90%) por 30 min. A leitura foi realizada a 570 nm em espectrofotômetro SYNERGY HT. Os resultados foram expressos em µmol de hidroperóxidos.mgproteína<sup>-1</sup>.

#### *Concentração de proteínas carboniladas (PCO)*

O conteúdo de proteínas carboniladas foi determinada pelo método de Levine et al. (1994) que se baseia na reação da 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) com proteínas carboniladas/oxidadas (apenas do tipo aldeído e cetona) formando dinitrofenilhidrazonas que podem ser detectadas a 358-370. Carbonilas com grupos funcionais ácidos carboxílicos, amidas e ésteres não podem ser detectadas por DNPH. Um volume de 100 µL de sobrenadante foi transferido para um tubo de 2 mL e misturado a 500 µL solução de DNPH (10 mM de 2,4-dinitrofenilhidrazina em 2 M de HCl). Para o branco HCl 2 M (sem adição de DNPH) foi utilizado. As amostras foram incubadas a 30 °C por 90 minutos. Após, as proteínas foram precipitadas com 500 µL de ácido tricloroacético 28% e centrifugação a 9.000 x g por 10 min. Os pellets de proteínas foram lavados duas vezes por suspensão em etanol/acetato de etila (1:1) seguida por centrifugação. As proteínas foram solubilizadas em cloreto de guanidina 6 M e os tubos foram centrifugados a 9.000 x g por 3 min para remover materiais insolúveis. O conteúdo de proteínas carboniladas foi determinado espectrofotometricamente a 363 nm.





Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Comissão de Ética no Uso de Animais  
(CEUA)



Nº 839

## CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento da CEUA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno da CEUA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

## CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEUA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

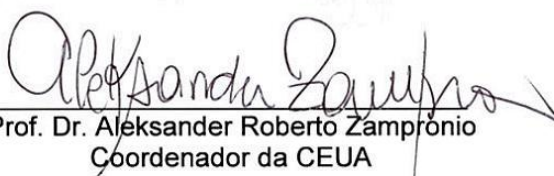
**PROCESSO:** 23075.039620/2014-74

**APROVADO:** 11/11/2014 – R.O. 09/2014

**TÍTULO:** Utilização de duas espécies de ciclídeos na avaliação da toxicidade dos herbicidas atrazina e mesotrione isolados e combinados

**AUTORES:** Marta Margarete Cestari, Laercio Dante Stein Piacini

**DEPARTAMENTO:** Genética

  
Prof. Dr. Aleksander Roberto Zamprônio  
Coordenador da CEUA