



REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA – RENORBIO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS – UFAL

AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE *Colossoma macropomum* G. Cuvier, 1818  
(TAMBAQUI) COMO ESPÉCIE SENTINELA PARA O HERBICIDA TRIFLURALINA

JAQUELINE MARIA DA SILVA

MACEIÓ-AL

2013

JAQUELINE MARIA DA SILVA

AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE *Colossoma macropomum* G. Cuvier, 1818  
(TAMBAQUI) COMO ESPÉCIE SENTINELA PARA O HERBICIDA TRIFLURALINA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia com o Ponto Focal no Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas como parte do requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia na área de concentração em Agropecuária.

**Orientadora: Dr<sup>a</sup> Fabiane Caxico de Abreu Galdino**

**Co-orientadora: Dr<sup>a</sup> Sônia Salgueiro Machado**

MACEIÓ-AL

2013

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

S586a Silva, Jaqueline Maria da.

Avaliação da sensibilidade de *Colossoma macropomum* G. Cuvier, 1818 (Tambaqui) como espécie sentinela para o herbicida trifluralina / Jaqueline Maria da Silva. – 2013.

86 f. : il. tabs.

Orientadora: Fabiane Caxico de Abreu Galdino.

Co-Orientadora: Sônia Salgueiro Machado

Tese (doutorado na Rede Nordeste de Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. RENORBIO. Maceió, 2013.

Inclui bibliografias.

1. Tambaqui (peixe). 2. Peixe - Amazônico. 3 *Colossoma macropomum*. 4. Dinitroanilina. 5. Colinesterase. 6. Meio ambiente. I. Título.

CDU: 543.061



CONFERE COM O ORIGINAL  
DATA: 23/05/2013

Assinado digitalmente por  
Tadeu Patêio Barbosa  
Secretário do PPGQB  
SIAPE 1927654

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia  
Universidade Federal de Alagoas  
BR 104 Km 14, Campus A. C. Simões - Tabuleiro dos Martins  
57072-970, Maceió-AL - Telefone: (82) 3214-1384 - Homepage: www.renorbio.org.br

### ATA - DEFESA DE TESE

Ata de Defesa de Tese de Doutorado da aluna JAQUELINE MARIA DA SILVA. Aos trinta (30) dias do mês de abril do ano de dois mil e treze, às 14:00h reuniu-se a banca de Defesa de Tese composta por Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fabiane Caxico de Abreu Galdino, Universidade Federal de Alagoas - UFAL, Orientadora/Presidente, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Angelina Bossi Fraga, UFAL, Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha, Universidade Federal do Ceará - UFC, Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto, UFAL, Dr. José Patrocínio Lopes, Companhia Hidro Elétrica do São Francisco - CHESF, e Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marília Oliveira Fonseca Goulart, UFAL perante a qual Jaqueline Maria da Silva, aluna regularmente matriculada no Curso de Doutorado em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO, Ponto Focal Alagoas, defendeu, para preenchimento do requisito de doutor, sua Tese intitulada "Avaliação da sensibilidade de *Colossoma macropomum* G. Cuvier, 1818 (tambaqui) como espécie sentinela para o herbicida trifluralina". A defesa da referida tese ocorreu, das 14:00 às 19:45, tendo a doutoranda sido submetida à sabatina, dispondo cada membro da banca do tempo para tal. Finalmente, a banca reuniu-se em separado e concluiu por considerar a doutoranda APROVADA por sua tese e sua defesa terem, por unanimidade, recebido o conceito A. Ficaram constatadas as seguintes pendências e recomendações prolatadas, as quais deverão ser cumpridas no prazo máximo de (06) seis meses, podendo ser prorrogada uma vez, por igual período: aceite de artigo derivado da tese em periódico com fator de impacto igual ou maior a 1,15 no JCR2012 ou depósito de patente.

Eu, Fabiane Caxico de Abreu Galdino, que presidi a Banca de Tese, assino a presente ata, juntamente com os demais membros e dou fé. Em Maceió - AL, 30 de abril de 2013.

*Fabiane Caxico de Abreu Galdino*  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fabiane Caxico de Abreu Galdino - UFAL  
(Orientadora/Presidente)

*Angelina Bossi Fraga*  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Angelina Bossi Fraga  
UFAL (Examinadora)

*Bruno Rocha*  
Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha  
UFC (Examinador)

*Emiliano de Oliveira Barreto*  
Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto  
UFAL (Examinador)

*José Patrocínio Lopes*  
Dr. José Patrocínio Lopes  
CHESF (Examinador)

*Marília Oliveira Fonseca Goulart*  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marília Oliveira Fonseca Goulart  
UFAL (Examinadora)

## AGRADECIMENTOS

À Professora Dr<sup>a</sup>. Fabiane Caxico de Abreu Galdino, minha orientadora e amiga, pelos vários anos de confiança e de ótima convivência. Obrigada por ter acreditado tanto em mim!

À Professora Dr<sup>a</sup>. Sonia Salgueiro Machado, que me recebeu tão bem no Laboratório de Bioquímica e Enzimologia. Muito obrigada pela colaboração que resultou no primeiro artigo desta tese, e por sua enorme generosidade em acreditar no meu potencial como pesquisadora!

Ao Pesquisador Dr. José Patrocínio Lopes, por sua importante colaboração para realização deste experimento sem o qual este trabalho não teria sido realizado e presença como membro da banca desse trabalho e que enriquecerá essa tese com valiosas sugestões. Muito obrigada!

À Professora Dra. Angelina Bossi Fraga pelo aceite do convite como membro da banca e espelho de profissionalismo. Obrigada pelas sugestões.

Ao Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto e o Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha pelas importantes sugestões.

À Profa Dra. Edma Carvalho de Miranda pelo empréstimo dos aquários onde foi realizado o experimento de tese.

Ao Prof. Dr. Renato Santos Rodarte, sempre muito gentil e disponível a ajudar na discussão dos dados que resultaram no segundo artigo desta tese. Muito obrigada!

Aos Professores Doutores Antônio Euzébio Goulart Santana e Marília Oliveira Fonseca Goulart, que me possibilitaram o acesso aos laboratórios sempre com ótima receptividade.

Ao Pesquisador da Embrapa Tabuleiro Costeiro João Gomes da Costa pela amizade, credibilidade e confiança, obrigada por sua importantíssima contribuição na análise estatística.

Aos colegas de Laboratório de Bioquímica e Enzimologia: Giovanne, Pedro, Thomaz, João, Amanda, Sara Rubia, Isadora, Gabriela, Humberto, Juliana e Cledson, pela amizade e ajuda. Obrigada!

À Fátima Lúcia, Professora da Universidade do Estado da Bahia (UNEB) e doutoranda nesta Universidade, pela amizade e grandiosa colaboração no término do trabalho no laboratório, envio dos artigos e por sua presença entre nós, Obrigada!

Aos colegas da CODEVASF nas pessoas de Sergio, Fernanda e Alexandre Delgado. Muito obrigada!

Ao Sr. Aldir por ser um amigo presente e mil e uma utilidades ajudando a todos que solicitem sua ajuda, Obrigada amigo! Por sua ajuda em todo o experimental desta tese.

À amiga de outras vidas Cenira Monteiro de Carvalho por seu apoio em todos os aspectos profissional, emocional e acima de tudo pela amizade de anos.

Aos amigos Dona Leone, minha comadre Alani e Augusto pela amizade.

Aos amigos Claudioneide, Angélica, Alessandro, Angelo e Cassiana. Muito bom saber que tenho vocês na minha vida, mesmo longe, sei que estão sempre presentes.

À minha mãe e irmã adotiva Cledjane que tanto me apoiaram durante esse período, especialmente no nascimento do meu filho João Carlos.

Ao meu marido Ruan Carlos, por todo amor e carinho, sempre! Também pela paciência e pela valiosa ajuda! Muito obrigada!!! Você é muito importante na minha vida!

Ao meu filho, benção divina, João Carlos, motivo no qual estou subindo mais um degrau! Vida da minha vida!!!

À CAPES pela concessão da bolsa de Doutorado.

Ao CNPQ pelo financiamento do projeto da tese.

À UFAL pela minha formação acadêmica de graduação e ao IQB com toda a infraestrutura por minha formação como doutora.

Sem sonhos, as perdas se tornam insuportáveis, as pedras do caminho se tornam montanhas, os fracassos se transformam em golpes fatais.  
Mas, se você tiver grandes sonhos... Seus erros produzirão crescimento, seus desafios produzirão oportunidades, seus medos produzirão coragem. Por isso, meu ardente desejo é que você nunca desista dos seus sonhos.

**Augusto Cury**

## RESUMO

O *Colossoma macropomum* (Tambaqui Amazônico) é uma espécie de peixe comercial importante e intensamente cultivado em consórcio com as culturas de *Oryza sativa* (arroz) em uma variedade de corpos de água na área do rio São Francisco, no Nordeste do Brasil. Formulações comerciais de herbicida contendo Trifluralina ( $\alpha, \alpha, \alpha$ -trifluoro-2,6-dinitro-N, N-dipropil-p-toluidina) são comumente utilizadas para controlar ervas daninha em campos de produção de arroz. O presente estudo teve como objetivo avaliar a sensibilidade de *C. macropomum* à trifluralina utilizando biomarcadores para analisar os efeitos de uma exposição aguda a esta substância. Nos testes de toxicidade *in vivo*, juvenis de *C. macropomum* foram expostos a quatro concentrações de trifluralina: 0,74; 1,5; 2,23 e 3,0  $\mu\text{mols} / \text{L}$  durante 96 horas com os controles negativos, positivos e solvente, respectivamente. O herbicida trifluralina apresentou um perfil de inibição dose-dependente na atividade da colinesterase-ChE do cérebro de *C. macropomum*. Na maior concentração de trifluralina foi observada uma diminuição na atividade da ChE em torno de 62%, enquanto que no músculo a inibição foi de 80% na maior concentração testada. O valor estimado da  $CL_{50}$  em 96 h para trifluralina foi de 1,25  $\mu\text{mols} / \text{L}$ . Os ensaios *in vitro* mostraram que a ChE cerebral de *C. macropomum* tem uma moderada sensibilidade à trifluralina (2,34  $\mu\text{mols} / \text{L}$ ), porém, com alta sensibilidade ao controle positivo - carbamato de eserina (0,158  $\mu\text{mols} / \text{L}$ ). Os resultados cinéticos, em presença de acetilcolina como substrato, com o homogenato de cérebro contendo atividade foram de  $0,043 \pm 0,015 \text{ mmol} / \text{L}$  e  $0,301 \pm 0,014 \text{ mmol} / \text{min} \cdot \text{mg}$  proteína para as constantes cinéticas aparentes  $K_m^{app}$  e  $V_{max}^{app}$ , respectivamente. Também foram avaliados os efeitos mutagênico, genotóxico e apoptótico da exposição de *C. macropomum* juvenil à trifluralina. No ensaio do cometa, os eritrócitos analisados, quando comparados ao controle negativo, apresentaram indução de danos ao DNA em todas as concentrações testadas. A maior frequência de micronúcleos e o elevado número de células em apoptose foram observados nos peixes tratados com concentrações de 1,5  $\mu\text{mols} / \text{L}$  com efeito significativo ( $p < 0,01$ ). Os resultados desse estudo indicam que a ChE do cérebro *C. macropomum* é um biomarcador confiável para ser utilizado no monitoramento ambiental de agrotóxicos no delta do rio São Francisco e outros rios do Brasil. Também ficou confirmado o potencial genotóxico e apoptótico da trifluralina em concentrações a partir de 1,5  $\mu\text{mols/L}$  para juvenis de *C. macropomum*.

**Palavras chaves:** Peixe, amazônico, Ensaio do cometa, Dinitroanilinas.

## ABSTRACT

Amazonian Tambaqui (*Colossoma macropomum*) is a commercial important fish species that is intensively cultivated in rice fish-cultures in a variety of water paddies in the area of the São Francisco river in the northeast of Brazil. Commercial formulations of herbicides containing Trifluralin ( $\alpha,\alpha,\alpha$ -trifluoro-2,6-dinitro-N,N-dipropyl-p-toluidine) are commonly used to control weed on the rice fields of the area. The present study aimed to investigate the sensitivity of *Colossoma macropomum* to trifluralin using biomarkers to understand the effects of an acute exposure to this substance. On the *in vivo* toxicity tests, *C. macropomum* juvenile were exposed to four concentrations of trifluralin: 0.74, 1.5, 2.23 and 3.0  $\mu\text{mol} / \text{L}$  for 96 hours, and compared with negative, positive controls and solvent, respectively. The herbicide trifluralin shows a dose-dependent inhibition profile on the brain *C. macropomum* cholinesterase activity. On the highest trifluralin concentration was observed a drop in the cholinesterase activity around 62 % and the inhibition of the muscle was 80 % at the highest concentration tested. The estimated value of 96 h  $\text{LC}_{50}$  for trifluralin was 1.25  $\mu\text{mol} / \text{L}$ . *In vitro* assays had shown that brain cholinesterase-ChE *C. macropomum* has a moderate sensitivity toward trifluralin (2.34  $\mu\text{mol} / \text{L}$ ) whereas the sensitivity to the carbamate eserine is much higher (0.158  $\mu\text{mol} / \text{L}$ ). In order to get the apparent kinetic constants for *C. macropomum* brain cholinesterase, kinetic assays were performed on brain homogenate in the presence of acetylthiocholine as substrate. The kinetic results in the presence of acetylthiocholine as substrate, the brain homogenate containing activity were  $0.043 \pm 0.015$   $\text{mmol} / \text{L}$  and  $0.301 \pm 0.014$  for  $\text{mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  protein  $K_m^{\text{app}}$  and  $V_{\text{max}}^{\text{app}}$  apparent kinetic constants, respectively. We also evaluated the mutagenic, genotoxic and apoptotic exposure of *C. macropomum* juvenile trifluralin. In the Comet assay, erythrocytes analyzed, compared to the negative control showed induction of DNA damage at all concentrations tested. The higher frequency of micronuclei and high numbers of apoptotic cells were observed in fish treated with concentrations of 1.5  $\mu\text{mol} / \text{L}$  with a significant effect ( $p < 0.01$ ). The results of this study indicate that brain ChE *C. macropomum* is a reliable biomarker for use in environmental monitoring of pesticides in the delta of the São Francisco river. It was also confirmed the genotoxic and apoptotic trifluralin at concentrations from 1.5  $\mu\text{mol} / \text{L}$  for juvenile *C. macropomum*.

**Key words:** Fish, Amazônico, Comet Assay, Dinitroaniline.

## LISTA DE FIGURAS

### Artigo I

- Figura 01** - Esquema simplificado da sinapse colinérgica.....32
- Figura 02** - Mecanismo geral de inibição da AChE, onde -X é o grupo de saída do agente organofosforado.....33
- Figura 03** - Estrutura química da trifluralina.....34
- Figura 04** - Tambaqui (*Colossoma macropomum*).....35
- Figura 05** - Preparação do homogenato de células do *Colossoma macropomum* (Tambaqui), A- Extração do cérebro, B- Pesagem do cérebro em balança analítica, C- Maceração, D- Extrato Bruto.....38
- Figura 06** - Preparação do sobrenadante de células, A- Descongelamento do músculo, B- Pesagem do músculo em balança analítica, C- Maceração, D- Produção do homogenato, E- Centrifugação, F- Sobrenadante.....39
- Figura 07** - Percentagem da ChE cerebral e muscular em diferentes concentrações do herbicida trifluralina para juvenis de *Colossoma macropomum* (Tambaqui) *in vivo*.....44
- Figura 08** - A equação de Michaelis-Menten da atividade ChE cerebral de *Colossoma macropomum* (Tambaqui) na presença de acetilcolina, como substrato.....47
- Figura 09** - Efeito de diferentes concentrações do carbamato de eserina sobre atividade ChE a partir do homogenato de célula do cérebro de juvenis de *Colossoma macropomum* (Tambaqui).....48
- Figura 10** - Efeito de diferentes concentrações do herbicida trifluralina sobre atividade ChE a partir do homogenato de célula do cérebro de juvenis de *Colossoma macropomum* (Tambaqui).....48
- Figura 11** - Análise SDS-PAGE e Nativa-PAGE com zimograma do homogenato de células do cérebro da ChE de juvenis de *Colossoma macropomum* (Tambaqui).....50

### Artigo II

- Figura 01** - Estrutura química da Trifluralina.....65
- Figura 02** - *Colossoma macropomum* (Tambaqui).....66
- Figura 03** - Localização opercular do *C. macropomum* (Tambaqui).....68

<b>Figura 04</b> - Dano ao DNA de cadeia simples de eritrócitos do sangue periférico de <i>C.macropomum</i> (Tambaqui).....	72
<b>Figura 05</b> - Eritrócitos de peixe com presença de micronúcleo.....	73
<b>Figura 06</b> - Eritrócitos de peixes com a presença de micronúcleo e anormalidades nucleares.....	74
<b>Figura 07</b> - Efeito apoptótico da trifluralina em diferentes concentrações.....	75

## LISTA DE TABELAS

### Artigo I

**Tabela 01** - As variáveis físico-químicas de qualidade da água no teste de toxicidade aguda do herbicida trifluralina com o *C. macropomum* (Tambaqui).....43

**Tabela 02** – Determinação da concentração letal do herbicida trifluralina em  $\mu\text{moles/L}$  para juvenis de *C. macropomum* (Tambaqui).....43

**Tabela 03** - Variação do teor de proteína, atividade Che e atividade específica no cérebro e músculo do *Colossoma macropomum* (Tambaqui) após 96 h em exposição *in vivo* a trifluralina.....4  
5

**Tabela 04** - Comparação das constantes de Michaelis Menten ( $K_m^{app}$ ), velocidade máxima ( $V_{max}^{app}$ ) e os valores de  $CI_{50}$  da colinesterase cerebral de diferentes espécies de peixes utilizando o carbamato de eserina.....48

### Artigo II

**Tabela 01** - Frequência média de cada classe de dano no DNA ( $\pm$  desvio padrão) determinado pelo ensaio do cometa em eritrócito periférico de *C. macropomum* exposto por 96h em diferentes concentrações do herbicida trifluralina.....71

**Tabela 02** – Frequência de micronúcleo em eritrócitos periférico de *Colossoma macropomum* (Tambaqui) exposto a trifluralina por 96 horas.....73

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência nacional de vigilância sanitária

AChE – Acetilcolinesterase

ATCh – Acetiltiocolina

ACh – Acetilcolina

BChE – Butirilcolinesterase

ChE – Colinesterase

CL<sub>50</sub> – Concentração Letal em 50% dos organismos expostos

CI<sub>50</sub> – Concentração Inibitória em 50% dos organismos expostos

CODEVASF – Companhia de Desenvolvimento dos Vales do Parnaíba e do São Francisco

CHESF – Companhia Hidro Elétrica do São Francisco

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

DMSO – Dimetilsulfóxido

EC – Ensaio do Cometa

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

EPA/US – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

FUNASA – Fundação Nacional de Saúde

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

Iso-OMPA – Pirofosfamida Tetraisopropil

$K_m^{app}$  - Constante de afinidade aparente

MN – Micronúcleo

OMS - Organização Mundial da Saúde

PBS - Tampão fosfato salino

TRF – Trifluralina

$V_{max}^{app}$  - Velocidade Máxima aparente

WHO - Organização Mundial de Saúde

CL<sub>50</sub> – Concentração Letal de 50% dos organismos

CI<sub>50</sub> – Concentração Inibitória de 50% da atividade

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	27
<b>4 ARTIGO I. INIBIÇÕES IN VIVO E IN VITRO DA COLINESTERASE CEREBRAL DE JUVENIS DE <i>Colossoma macropomum</i> (TAMBAQUI) EXPOSTOS AO HERBICIDA TRIFLURALINA</b>	
<b>Resumo</b> .....	28
<b>4.1 Introdução</b> .....	30
<b>4.2 Material e Métodos</b> .....	34
4.2.1 Produtos Químicos.....	34
4.2.2 Purificação da Trifluralina (TRF).....	35
4.2.3 Animais.....	35
4.2.4 Preparo do teste experimental.....	36
4.2.5 Testes preliminares.....	36
4.2.6 Teste de toxicidade <i>in vivo</i> .....	36
4.2.7 Variáveis de qualidade de água.....	37
4.2.8 Preparação do extrato cerebral e muscular.....	37
4.2.9 Determinação da atividade da ChE.....	40
4.2.10 Teor de proteína.....	40
4.2.11 Ensaio cinéticos .....	41
4.2.12 Inibição enzimática <i>in vitro</i> .....	41
4.2.13 Eletroforese.....	42
4.2.14 Análises estatísticas.....	42
<b>4.3 Resultados</b> .....	42
4.3.1 Teste toxicológico <i>in vivo</i> .....	42
4.3.2 Parâmetros cinéticos ChE e de exposição <i>in vitro</i> .....	46
4.3.3 Eletroforese.....	49
<b>4.4 Discussão</b> .....	50
<b>4.5 Conclusão</b> .....	54
<b>4.6 Referências</b> .....	54

**5 ARTIGO II. AVALIAÇÃO DO EFEITO MUTAGÊNICO E GENOTOXICO DO HERBICIDA TRIFLURALINA ATRAVÉS DO ENSAIO DO COMETA, TESTE DO MICRONÚCLEO E VERIFICAÇÃO DE APOPTOSE EM *Colossoma macropomum* (TAMBAQUI)**

<b>Resumo</b> .....	61
<b>5.1 Introdução</b> .....	63
<b>5.2 Material e Métodos</b> .....	65
5.2.1 Produtos químicos.....	65
5.2.2 Animais.....	66
5.2.3 Espécie de peixe experimental.....	66
5.2.4 Testes preliminares.....	66
5.2.5 Teste de toxicidade <i>in vivo</i> .....	67
5.2.6 Qualidade da água.....	67
5.2.7 Coleta e diluição da amostra.....	67
5.2.8 Ensaio do cometa.....	68
5.2.9 Teste do micronúcleo.....	69
5.2.10 Numero de células em apoptose.....	69
5.2.11 Análises estatísticas.....	70
<b>5.3 Resultados</b> .....	70
5.3.1 Ensaio do cometa.....	70
5.3.2 Teste do micronúcleo.....	72
5.3.3 Numero de células em apoptose.....	74
<b>5.4 Discussão</b> .....	75
<b>5.5 Conclusão</b> .....	77
<b>5.6 Referências</b> .....	77
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	83
<b>7 PERSPECTIVAS</b> .....	84
<b>8 ANEXOS</b> .....	85

## APRESENTAÇÃO DOS ARTIGOS

Este trabalho visa avaliar a sensibilidade de *C. macropomum* Cuvier 1818 (Tambaqui) ao herbicida trifluralina e propor a indicação deste peixe como espécie sentinela, na região do Delta do Rio São Francisco e em outros rios brasileiros, estando organizado da seguinte maneira:

### INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Apresenta a justificativa da utilização de biomarcadores que forneçam informações relevantes sobre efeitos da exposição ao herbicida, e analisa a ação do herbicida trifluralina na neurotoxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade em *C. macropomum*.

### ARTIGOS - I. II

Trata de metodologias utilizadas para alcançar os objetivos propostos, assim como os resultados, as discussões e as conclusões que são apresentados sobre forma de duas publicações:

I) INIBIÇÕES *in vivo* E *in vitro* DA COLINESTERASE CEREBRAL DE JUVENIS DE *Colossoma macropomum* (TAMBAQUI) EXPOSTOS AO HERBICIDA TRIFLURALINA (Artigo 1) – Analisou a sensibilidade da enzima para utilização em biossensores e testes com drogas anticolinesterásicas.

II) AVALIAÇÃO DO EFEITO MUTAGÊNICO E GENOTÓXICO DO HERBICIDA TRIFLURALINA, ATRAVÉS DO ENSAIO DO COMETA, TESTE DO MICRÔNÚCLEO E APOPTOSE EM *Colossoma macropomum* (TAMBAQUI) (Artigo 2) – Avaliou a sensibilidade genética do Tambaqui quanto a diferentes concentrações de trifluralina.

### DISCUSSÃO, CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Analisa e compara os dados obtidos, conclui sobre o trabalho.

## 1. INTRODUÇÃO

Anualmente no mundo são consumidos, cerca de 2,5 milhões de toneladas de agrotóxicos. Deste consumo, o Brasil representa mais de 300 mil toneladas (SINDAG, 2012). Segundo dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2012), o Brasil usa 19% de todos os defensivos agrícolas produzidos no mundo, enquanto os Estados Unidos respondem por 17% e o restante dos países 64%. Esta intensa utilização de agrotóxicos, que vem ocorrendo há décadas no Brasil, tem sido pouco monitorada por estudos científicos, apenas em algumas regiões como Sul e Sudeste. Segundo Preza; Augusto (2012), estudos acerca das condições de riscos relacionados a agrotóxicos no Nordeste são ainda pouco representativos quando comparados com os das regiões Sul e Sudeste, tornando essa pesquisa relevante frente ao modelo tecnológico dominante de produção agrícola, o qual utiliza intensivamente os agrotóxicos.

No Nordeste, alguns estudos têm sido realizados em diversas áreas, como pesquisas na costa marítima impactada com petróleo (NASCIMENTO et al. 2000), estudos ambientais no delta do rio São Francisco, que abriga grande produção agrícola correspondendo a 5,1% da produção total (CODEVASF, 2006). Esta área é caracterizada pela alta produção de arroz irrigado que, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), foi de cerca de 11 milhões de toneladas em 2010 (IBGE, 2011).

No cultivo de *Oriza sativa* (arroz) irrigado no delta do rio São Francisco são empregados vários herbicidas, tais como: trifluralina, clamazone, quinclorac, bentazona, 2,4-D, propanil, alaclor, paraquat, atrazina. Todos estes são utilizados para controlar ervas daninhas (COSTA et al. 2008; CATTANEO et al. 2012). A Companhia de Desenvolvimento dos Vales do rio São Francisco e do Parnaíba vem motivando o consórcio entre as culturas de arroz e a criação de peixes nas águas rasas dos arrozais, com o cultivo da rizipiscicultura (CODEVASF, 2006). Os peixes são importantes bioindicadores para o monitoramento da poluição ambiental (BOLIS et al. 2001). Estes organismos representam o final do nível trófico na cadeia alimentar aquática (BALDISSEROTTO, 2002). Nas próximas páginas são apresentados dois artigos que objetivaram analisar os efeitos da exposição aguda do herbicida trifluralina em *C. macropomum* (Tambaqui), utilizando biomarcadores que forneçam informações do potencial desta espécie como sentinela.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Colossoma macropomum* (Tambaqui)

O peixe *C. macropomum* (Tambaqui) é um characiforme com pele coberta de escamas, quase sempre ciclóides de cabeça sem escamas, nadadeiras com raios moles e os seus dentes são importantes ferramentas na sua identificação etária. A maioria possui nadadeira adiposa, e não possuem barbilhões. Possuem um órgão denominado complexo de Weber, osso operculares completos, bexiga natatória (BALDISSEROTTO, 2002). É o grupo de peixe que possui mais espécies de água doce, nativo da bacia amazônica e habitante dos rios do Brasil, Venezuela, Colômbia, Peru e Bolívia (TAPHORN, 1992; CUNHA; SANTOS, 2011). Aspectos ecológicos dessa espécie demonstram ações migratórias de reprodução, tróficas e de dispersão, onde se alimenta de frutos, sementes, caramujos, zooplâncton e fitoplanctons (ROUBACH; SAINT-PAUL, 1944).

Diversas pesquisas com essa espécie têm demonstrado sua sensibilidade aos agrotóxicos em estudos de análises bioquímicas, imunológicas e mutagênicas (ASSIS et al. 2007; SALAZAR-LUGO et al. 2009; KONEN; ÇAVAS, 2008). O tambaqui é a segunda espécie de água doce mais explorada comercialmente no Brasil, apresenta grande facilidade de obtenção de juvenis, bom potencial de crescimento, alta produtividade e sua criação apresenta-se como alternativa para manter o equilíbrio ambiental (CUNHA; SANTOS, 2011). Organismos como o Tambaqui da espécie *C. macropomum* que pertencem ao topo da cadeia alimentar são comumente utilizados por possuírem intrínseca relação com toda a cadeia inferior, indicando respostas de efeitos crônicos, acumulativos e persistentes no nível de cadeia, além de efeitos diretos no nível do indivíduo (LINS et al. 2010).



Fonte: <http://www.agropesca.net/nossos-produtos/especies-de-peixes/tambaqui/>

## 2.2 Ecotoxicologia e o uso de biomarcadores

Os organismos mais utilizados em pesquisas ecotoxicológicas, destacam-se: Peixes, microalgas, microcrustáceos, equinóides, poliquetas, oligoquetas e bactérias, representando os mais diversos ecossistemas e níveis tróficos (OLIVI; ESPÍNDOLA 2008). Gerando subsídios importantíssimos para uma melhor avaliação e caracterização dos efeitos agudos e crônicos de vários agentes tóxicos.

CrITÉRIOS de seleção da espécie vêm sendo adotados para escolha do organismo teste como: abundância e disponibilidade; significativa representação ecológica dentro das biocenoses; cosmopolitismo da espécie; conhecimento da sua biologia, fisiologia e hábitos alimentares; estabilidade genética e uniformidade de suas populações; baixo índice de sazonalidade; sensibilidade constante e apurada; importância comercial; facilidade de cultivo em laboratório e, se possível, a espécie deve ser nativa para melhor representatividade dos ecossistemas (RAND; PETROCELLI, 1995).

Os estudos com esses organismos destacam sua sensibilidade frente ao biomonitoramento ambiental, com análises a nível bioquímico, fisiológico, morfológico, comportamental, etc. (MAGALHÃES; FERRÃO, 2008). Esses estudos se iniciaram com *Daphnia magna* e *Danio rerio* na década de 1980 por agências ambientais no mundo todo, principalmente nos EUA e na Europa, foram os primeiros a desenvolver protocolos padronizados de testes de toxicidade utilizando organismos aquáticos (USEPA 1996, 2002, OECD 1984-2004).

Atualmente tem sido utilizado diversas espécies de peixes como no trabalho de Andrade et al. (2004), Gluszczak et al. (2006), Cattaneo et al. (2011), Wilges et al. (2012) que são: *Agonostomus catalai*, *Bagre marinus*, *Cyprinus carpio*, *Leporinus obtusidens*, *Danio rerio* em estudos toxicológicos.

A utilização de peixes em estudos de ecotoxicologia tem se mostrado vantajosa em relação aos testes tradicionais com outros organismos (LEMOS et al. 2005). Os peixes demonstram efeitos toxicológicos aos agentes tóxicos em concentrações inferiores as utilizadas em mamíferos, permitindo a avaliação das substâncias que são potencialmente teratogênicas, mutagênicas, aneugênicas e cancerígenas para os seres humanos (LEMOS et al. 2007).

Segundo Amorim (2003), o diagnóstico precoce de contaminação por agrotóxico pode minimizar danos maiores à saúde animal, principalmente quando para este diagnóstico foi utilizado parâmetros biológicos com a finalidade de estudar a exposição às substâncias químicas para estimar o risco dos organismos expostos. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2000), os biomarcadores compreende toda substância ou seu produto de biotransformação, assim como qualquer alteração bioquímica precoce, cuja determinação nos fluidos biológicos, tecidos ou ar exalado, avalie a intensidade de exposição e o risco à saúde. E estes podem ser classificados em três classes: de exposição, de efeito e de suscetibilidade (FREIRE et al. 2008).

Os biomarcadores de exposição refletem a distribuição química de compostos orgânicos e seus metabólitos através do organismo, por isso são identificados como dose interna, estabelecendo uma ligação entre a exposição externa e a quantificação da exposição interna (AMORIN, 2003). Conseqüentemente a dose externa se refere à concentração do agente químico presente no ambiente em contato com organismo. Teoricamente, a distribuição da substância no organismo pode ser traçada por vários níveis biológicos, como tecidos e células, até seu alvo definitivo (JONSSON; CASTRO, 2005).

Os biomarcadores de efeito são aqueles que medem uma alteração biológica em um estágio ainda reversível (ou precoce), quando ainda não representa agravo à saúde. Desta forma, a ligação dos biomarcadores entre exposição e efeito contribui para a definição da relação dose-resposta. Os biomarcadores de suscetibilidade permitem identificar aqueles indivíduos na população que têm uma diferença genética ou adquirida (MAGALHÃES; FERRÃO, 2008).

Alguns autores como Amorim (2003) e Linde-Arias et al. (2007) mencionaram outros tipos de biomarcadores de efeito, os quais possibilitam a avaliação do mecanismo de ação da substância química no órgão alvo a partir de uma medida da alteração biológica associada a esta ação. Dentre esses podem ser citados: biomarcadores de nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, genotoxicidade e neurotoxicidade.

A avaliação de um biomarcador ocorre em conjunto com as características dos organismos testes, que são abordadas em bioensaios de forma a analisar suas respostas frente à exposição tóxica (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003). Pesquisas na área de ecotoxicologia vêm sendo realizadas principalmente quanto ao Sistema de Biomonitoramento Automático em Tempo Real que utiliza organismos sentinela na detecção de alterações comportamentais ou fisiológicas durante a exposição ao contaminante (CASTRO; JONSSON,

2012). Contudo, a aplicação de métodos rápidos e de fácil realização como os biomarcadores de exposição, efeito e em tempo real podem gerar vantagens econômicas quando comparados à aplicação de protocolos tradicionais de análise que utilizam reagentes e equipamentos de alto custo e de maior tempo de realização (LINDE-ARIAS et al. 2008).

Segundo Amorim (2003a), esses biomarcadores analisados conjuntamente, possibilitam elevar o grau de confiabilidade com o qual podem estimar os riscos à saúde animal e humano causados pelos diversos tipos de poluentes ambientais. Martins; Bianchini (2011) demonstram uma preocupação evidente quanto aos efluentes industriais, agrícolas e esgoto doméstico que são compostos por uma mistura de muitos poluentes, que podem afetar os ecossistemas de diferentes maneiras.

Desde 1988, estudos de biomonitoramento ambiental vêm sendo realizados na bacia hidrográfica do Rio Caí, no Rio Grande do Sul. Os resultados desses estudos mostram degradação no ambiente impactado pelo complexo industrial, com a presença de compostos mutagênicos e citotóxicos (VARGAS et al. 2007).

Outro Rio bastante impactado por indústrias siderúrgicas, localizado no estado de São Paulo é o Rio Paraíba do Sul que tem sido monitorado por efeitos genotóxicos nos organismos aquáticos analisados (LINDE-ARIAS et al. 2008).

De modo semelhante, no Rio Barigui e em seus afluentes no Estado do Paraná, foi verificada a efetividade das ações de monitoramento e fiscalização quanto ao problema da poluição da água e a contaminação dos organismos aquáticos, pois estes formam um dos tripés da gestão ambiental (ALVES; MENDES, 2010). Ainda na região Sul do Brasil, a bacia hidrográfica do rio Tubarão foi monitorada com o auxílio dos biomarcadores de exposição e genotoxicidade, devido à intensificação das ações antrópicas consideradas impactantes (OSÓRIO, 2011).

O estudo de Figueiredo et al. (2007), desenvolvido no Estado do Ceará no Nordeste do Brasil, representa estudos iniciais quanto à vulnerabilidade dos reservatórios a eutrofização causada pela alta carga poluidora principalmente pela atividade agrícola e pecuária. A verdadeira preocupação da contaminação de ambientes aquáticos por agrotóxicos pode não ser percebida pelo fato de muitos desses compostos permanecerem em níveis subletais no ambiente aquático por períodos curtos e por serem pouco estudados por não causarem morte imediata nos peixes (FANTA et al. 2003). No entanto, a contaminação subletal pode alterar significativamente vários processos fisiológicos, bioquímicos e morfológicos ao penetrarem nos órgãos dos organismos aquáticos (SANCHO et al. 1992 apud LINS et al. 2010).

Várias pesquisas de diagnóstico e de biomonitoramento podem fornecer novas abordagens e informações sobre a situação atual de nossas águas e organismos aquáticos, dentre eles grande parte enfocam as nossas bacias hidrográficas, uma vez que os corpos hídricos são os receptores finais, seja pelo escoamento superficial, pela lixiviação ou mesmo pelo aporte direto de poluentes (OSÓRIO, 2011). As informações fornecidas pelos biomarcadores a respeito da toxicidade de agentes tóxicos para peixes, e os resultados integrados aos parâmetros como os de biossinalização, hematológicos, osmo-iônicos, metabólicos e bioquímicos são importantes para a avaliação da saúde dos peixes e para o biomonitoramento de ambientes impactados.

Nas próximas páginas são apresentados dois artigos submetidos que objetivaram analisar os efeitos da exposição aguda ao herbicida trifluralina em *Colossoma macropomum* (Tambaqui) utilizando biomarcadores que forneçam informações do potencial desta espécie como sentinela.

## REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. *Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA): relatório de atividades de (2009)*. Disponível: <[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/8ef32a80481aa03d85989570623c4ce6/RELATORIO\\_PARA\\_2009.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/8ef32a80481aa03d85989570623c4ce6/RELATORIO_PARA_2009.pdf?MOD=AJPERES)>. Acesso em: 12 jul. 2010.

ALVES, E.I.S.; MENDES, M.A. Avaliação de parâmetros de qualidade da água com base no uso pretendido. Programa de apoio à iniciação científica-PAIC, p.18, 2010.

AMORIN, L.C.A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira Epidemiologica**, Vol. 6, suple.1, 2003.

AMORIN, L.C.A. O Uso dos Biomarcadores na Avaliação da Exposição Ocupacional a Substâncias Químicas. **Revista Brasileira Medicina do Trabalho**, Belo Horizonte . Vol. 1 . No 2 . p. 124-132, 2003a.

ANDRADE, V. M.; FREITAS, T. R. O.; SILVA, J. Comet assay using mullet (*Mugil sp.*) and sea catfish (*Netuma sp.*) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic. **Environment Mutation Research** v. 560, p. 57–67, 2004.

ASSIS, C.R.D.; AMARAL, I.P.G.; CASTRO, P.F.; CARVALHO, L.B.JR.; BEZERRA, R.S. Effect of dichlorvos on the acetylcholinesterase from Tambaqui (*Colossoma macropomum*) brain. **Environmetal Toxicology Chemistry**, v. 26, p.1451–1453, 2007.

BALDISSEROTTO, B. Fisiologia de peixes aplicada á piscicultura. Santa Maria: pag. 212. Ed. UFSM., 2002.

BOLIS, C.L., PICCOLELLA, M., DALLA VALLE, A., RANKIN, J.C. Fish as model in pharmacological and biological research. **Pharmacology Research**, v. 44, p. 265–280, 2001.

CASTRO, V.L.S.S.; JONSSON, C.M. Proposta conceitual de estudo para a integração e gerenciamento do uso de marcadores bioquímicos de contaminação ambiental. **Biotemas**, 25 (1), p. 159-170, 2012.

CATTANEO R., MORAES B.S., LORO V.L., PRETTO L., MENEZES C., SARTORI G.M.S., CLASEN B., AVILA L.A., MARCHESAN E., ZANELLA E. Tissue biochemical alterations of *Cyprinus carpio* exposed to commercial herbicide containing clomazone under rice-field conditions. **Archive Environmental Contamination Toxicology**, v. 62, p. 97–106, 2012.

CODEVASF. Aqüicultura: Codevasf se arma para a revolução azul. Plataforma para o futuro. Brasília. Brasília. Instituto FNP, p. 48, 2006.

COSTA L.L.F., SANT'ANA E.S., SUCHARA E.S., BENATO V.S., CARASEK E. Determinação de herbicidas usados no cultivo de arroz irrigado na região sul do estado de santa catarina através da SPME-GC-ECD. **Quimica Nova**, 31, p.79-83, 2008.

CUNHA, V. V., SANTOS, A. J. Crescimento de juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum* (cuvier, 1818), em tanques-rede com diferentes densidades populacionais em jiparaná, RO, **Amazônia: Ciência & Desenvolvimento**, Belém, v. 6, n. 12, p.185, 2011.

FANTA, E. et al. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 54, n. 2, p. 119-130, 2003.

FREIRE, M. M.; SANTOS, G. V.; GINUINO, I. S. F. Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos, **Revista Brasileira Oecologia**, v. 12, n. 3, p.347 – 354, 2008.

FIGUEIREDO, M.C.B.; TEIXEIRA, A.S.; ARAÚJO, L.F.P. et al. Evaluation of reservoirs environmental vulnerability to eutrophication. **Engenharia Ambiental e Sanitária**, Vol.12 - Nº 4, p. 399-409, 2007.

GLUSCZAK, L.; MIRON, D. S.; CRESTANI, M.; FONSECA, M. B.; PEDRON, F. A.; DUARTE, M. F.; VIEIRA, V. L. P. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*) **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 65, p. 237–241, 2006.

KONEN, S., ÇAVAS, T. Genotoxicity testing of the hericide trifluralin and its commercial formulation Treflan using the piscine micronucleus test. **Environ. Mol. Mutagen.** v. 49 (6), p. 434–438, 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. LEVANTAMENTO SISTEMÁTICO DA PRODUÇÃO AGRÍCOLA - Pesquisa Mensal de Previsão e Acompanhamento das Safras Agrícolas no Ano Civil. v.25 n.02 p.1-88 fev. 2011.

JONSSOM, C. M.; CASTRO, V. L. Bioindicadores e biomarcador de agroquímico no contexto da relação saúde-ambiente. Embrapa, meio ambiente. Jaguariúna, Outubro 2005.

LEMOS, N.G.; DIAS, A.L.; SILVA-SOUZA, A.T.; MANTOVANIA, M.S. Evaluation of environmental waters using the comet assay in *Tilapia rendalli*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 19, p. 197–201, 2005.

LEMOS, C.T.; RODEL, P.M.; TERRA, N. R.; OLIVEIRA, N. C.D.; ERDTMANN, B. River water genotoxicity evaluation using micronucleus assay in fish erythrocytes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 66, p. 391–401, 2007.

LINS, J.A.P.N.; KIRSCHNIK, P.G.; QUEIROZ, V.S.; CIRIO, S.M. Uso de peixes como biomarcadores para o monitoramento de ambientes aquáticos. **Revista Acadêmica Ciências Agrárias e Ambiental**, Curitiba, v. 8, n. 4, p. 469-484, 2010.

LINDE-ARIAS, A.R.; BUSS, D.F.; ALBUQUERQUE, C.; INACIO, A.F.; FREIRE, M.M.; EGLER, M.; MUGNAI, R. & BAPTISTA, D.F. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 12(1), p. 61-72, 2007.

LINDE-ARIAS, A.R.; INÁCIO, A.F.; NOVO, L.A.; DE ALBUQUERQUE, C.; MOREIRA, J.C. Multibiomarker approach in fish to assess the impact of pollution in a large Brazilian river, Paraíba do Sul. **Environmental Pollution**, in press. v. 156, p. 974-979, 2008.

MAGALHÃES, D.P.; FERÃO FILHO, A.S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12(3), p. 355-381, 2008.

MARTINS S.E., BIANCHINI A. Toxicity tests aiming to protect Brazilian aquatic systems: current status and implications for management. **Journal Environmental Monitoring**, v. 13, p.18-66, 2011.

NASCIMENTO, A.; SMITH, D. H.; PEREIRA, S. A.; ARAUJO, M. M. S.; SILVA, M. A.; MARIANI, A. M. Integration of varying responses of different organisms to water and sediment quality at sites impacted and not impacted by the petroleum industry, **Aquatic Ecosystem Health and Management**, v. 3, p. 449–458, 2000.

OSÓRIO, F.H.T. Avaliação da qualidade da água do rio tubarão através de biomarcadores em *Geophagus brasiliensis* (Quay e Gaimard, 1824). Dissertação, p.79. 2011.

OECD – (Organization for Economic Cooperation and Development). 1984. OECD Guidelines for testing chemicals – fish, prolonged toxicity test: 14 day study guideline 204, p.9.

OECD – (Organization for Economic Cooperation and Development). 2004. OECD Guidelines for testing chemicals – *Daphnia* sp. Acute immobilization test. Guideline 202. p.12.

PREZA, D.L.C.; AUGUSTO, L.G.S. Vulnerabilidades de trabalhadores rurais frente ao uso de agrotóxicos na produção de hortaliças em região do Nordeste do Brasil. **Revista brasileira Saúde ocupacional**, São Paulo, v. 37 (125), p. 89-98, 2012.

RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. Mutagênese Ambiental. Editora da ULBRA. Canoas-RS, p. 356, 2003.

SALAZAR-LUGO, R., ESTRELLA, A., OLIVEROS, A., ROJAS-VILLARROE, E., VILLALOBOS, B.L., LEMUS, M. Paraquat and temperature affect nonspecific immune response of *Colossoma macropomum*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 27, p. 321–326, 2009.

SANCHO, E. et al. Organophosphorus diazinon induced toxicity in the fish *Anguilla anguilla* L. Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Comparative **Pharmacology and Toxicology**, v. 103, p. 351-356, 1992.

Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Defesa Agrícola. Informações do setor. Disponível em <[www.sindag.com.br](http://www.sindag.com.br)>. Acessado em 03/12/2012.

TAPHORN, D. C. **The characiform fishes of the apure river drainage**. Caracas: Biollania, p. 537, 1992.

USEPA – Environmental Protection Agency, 1996, EPA 712-C-96-114. O PPTS 850.1010. Aquatic invertebrate toxicity test, freshwater daphnids: Ecological effects test Guidelines. Washington, USA.

USEPA- Environmental Protection Agency, 2002. EPA-821-R-02-1. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. Ed5 th. Washington. USA.

VARGAS, V.M.F.; ROSA, D.P.; SARMENTO, E.C.; ROCHA, A.J.A.V.; TAGLIARI, K.C.; HORN, R.C.; CARDOZO, T.R.; PEREIRA, T.S.; PASTORIZA, T.F.; SANTOS, C.A. Atividade mutagênica como parâmetro ambiental para avaliar a qualidade em bacias hidrográficas. **Revista Fepam**, Porto Alegre, v.1, n.1, p.4-11, 2007.

WILGES, K. L.; ROSEMBERG, D. B.; PERREIRA, I. C. B.; AZEVEDO, M. B.; RICHETTI, S. K.; LEÃO, J. C.; YUNES, J. S.; BONAN, C. D.; BOGO, M. R. Microcystin – LR acute exposure increases AChE activation in zebrafish (*Danio rerio*) brain. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**. v. 155, p. 247-252. 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION — International Programme on Chemical Safety (IPCS) — *Environmental Health Criteria 214: Human exposure assessment*, Geneva; 2000.

### 3. OBJETIVOS

#### Objetivo Geral

Analisar os efeitos da exposição aguda do *C. macropomum* (Tambaqui) ao herbicida trifluralina utilizando biomarcadores que forneçam informações do potencial desta espécie como sentinela para a região do delta do rio São Francisco e outros rios do Brasil.

#### Objetivos Específicos

- Classificar o tipo de toxicidade causada pelo herbicida trifluralina e determinar a CL<sub>50</sub> em 96 h para *C. macropomum*;
- Avaliar os efeitos, *in vivo* e *in vitro* causados pelo herbicida trifluralina na espécie *C. macropomum*, por meio da atividade da enzima colinesterásica cerebral e muscular;
- Avaliar os efeitos citotóxicos causados pelo herbicida trifluralina na espécie *C. macropomum*, através do teste do micronúcleo, ensaio do cometa e número de células em apoptose em sangue peritoneal;
- Verificar a possibilidade de indicar a espécie *Colossoma macropomum*, como uma espécie sentinela para os rios do Brasil.

#### 4. ARTIGO I - INIBIÇÕES *IN VIVO* E *IN VITRO* DA COLINESTERASE CEREBRAL E MUSCULAR DE JUVENIS DE *Colossoma macropomum* (TAMBAQUI) EXPOSTOS AO HERBICIDA TRIFLURALINA\*

##### RESUMO

*Colossoma macropomum* (Tambaqui Amazônico) é uma espécie de peixe dominante, comercialmente importante e intensamente cultivado no consórcio de rizipiscicultura em uma variedade de corpos d'água na área do rio São Francisco, no Nordeste do Brasil. Formulações comerciais de herbicida contendo Trifluralina ( $\alpha, \alpha, \alpha$ -trifluoro-2,6-dinitro-N,N-dipropil-p-toluidina) são comumente utilizadas para controlar ervas daninhas em campos de *Oryza sativa* (arroz). O principal objetivo deste estudo foi avaliar *in vivo* e *in vitro* os efeitos inibitórios do herbicida trifluralina na colinesterase -ChE cerebral e muscular de *C. macropomum*. Após 96 horas de exposição *in vivo* a diferentes concentrações (0,74; 1,5; 2,23; 3,0  $\mu\text{mol/L}$ ), a atividade da ChE do cérebro de *C. macropomum* foi inibida com um efeito dose dependente que mostra uma inibição de 62 %; no músculo a inibição foi de 80% na maior concentração testada. A estimativa do valor da  $CL_{50}$  após 96 h para trifluralina foi de 1,25  $\mu\text{mol/L}$ . O homogenato ChE cerebral apresentou valores de  $0,043 \pm 0,015$  mmol/L e  $0,301 \pm 0,014$  mmol/min-1.mg proteína para as constantes cinéticas aparentes  $K_m^{app}$  e  $V_{max}^{app}$  respectivamente, na presença de acetilcolina. *In vitro*, a ChE cerebral de *C. macropomum* tem uma sensibilidade moderada à trifluralina de 2,34  $\mu\text{mol/L}$ . No entanto, com alta sensibilidade para o carbamato de eserina de 0,158  $\mu\text{mol/L}$ , indicando que a ChE do cérebro de *C. macropomum* é um biomarcador confiável para ser utilizado no monitoramento ambiental de compostos anticolinérgicos.

**Palavras-chave:** Bioindicadores; Peixe amazônico; Colinesterase; Parâmetros Cinéticos.

\*Artigo submetido para publicação no Archives Environmental Contamination Toxicology

## ABSTRACT

*Colossoma macropomum* (Amazonian Tambaqui) is a dominant and highly adaptable fish species that is intensively cultivated in rice fish cultures in a variety of water paddies in the area of the São Francisco River in northeast Brazil. Commercial formulations of herbicides containing Trifluralin ( $\alpha,\alpha,\alpha$ -trifluoro-2,6-dinitro-N,N-dipropyl-p-toluidine) are commonly used to control weed or grain yield the rice fields of the area. Since *C. macropomum* is a commercial important species and herbicides can inhibit cholinesterase-ChE activity, the main goal of this study was to evaluate *in vivo* and *in vitro* inhibitory effects of pure trifluralin in brain cholinesterase from *C. macropomum*. After 96 hours of *in vivo* exposure to different concentrations of trifluralin- (0.74, 1.5, 2.23, 3.0  $\mu\text{moles/L}$ ), *C. macropomum* brain ChE activity was inhibited in a dose-dependent manner, showing 62%; muscle inhibition was 80% at the highest concentration tested. The estimated 96 h  $\text{LC}_{50}$  value for trifluralin was 1.25  $\mu\text{mol/L}$ . Brain ChE homogenate showed values of  $0.043 \pm 0.015 \text{ mmol.L}^{-1}$  and  $0.301 \pm 0.014 \text{ mmol/min-1.mg protein}$  for the apparent kinetic constants  $K_m^{\text{app}}$  and  $V_{\text{max}}^{\text{app}}$  respectively in presence of acetylthiocholine as substrate. *In vitro* inhibitory assays showed that *C. macropomum* brain ChE has a moderate sensitivity to trifluralin (2.34  $\mu\text{mol/L}$ ). However, its sensitivity to eserine is much higher (0.158  $\mu\text{mol/L}$ ) indicating that *C. macropomum* brain ChE is a reliable biomarker to be employed in environmental monitoring of anticholinergic compounds.

**Keywords:** Biomarkers; Fish amazônico, Cholinesterase; Kinetic parameters

## 4.1. INTRODUÇÃO

A avaliação da sensibilidade de espécies-chave a poluentes químicos é essencial para a correta proteção de seus habitats. Os peixes são os organismos mais indicados para controle da poluição em sistemas aquáticos. O Brasil tem a maior biodiversidade de peixes do mundo, abrigando 3.000 peixes de água doce (MARTINS; BIANCHINI, 2011). Embora, ao longo da última década, os ensaios ecotoxicológicos tenham melhorado significativamente no Brasil, o número de espécies que foram testadas permanece baixo e a maior parte das pesquisas são realizadas com espécies das regiões Sul e Sudeste do Brasil.

O *Colossoma macropomum* (Tambaqui) espécie amazônica foi introduzido na década de 80 no delta do rio São Francisco na região Nordeste do Brasil (10°27'S, 36°25'E) (WOYNAROVICH, 1993). Atualmente, *C. macropomum* é uma espécie altamente adaptada e predominante em uma variedade de corpos d'água na região do delta onde tem sido intensamente cultivado pela Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e do Parnaíba (CODEVASF).

O rio São Francisco tem um comprimento de 2.900 km (OAS / OSDE, 2005) com uma área de aproximadamente 30.000 km<sup>2</sup> (CODEVASF, 2006). Esta área é caracterizada pela alta produção de *Oryza sativa* (arroz) que em 2010 foi de aproximadamente 11 milhões de toneladas (IBGE, 2011). São utilizados no controle de plantas daninhas em áreas de produção agrícola herbicidas como trifluralina, clamazone, quinclorac, bentazona, 2, 4-D, propanil, alaclor, paraquat, atrazina (COSTA et al. 2008; CATTANEO et al. 2012).

A trifluralina ( $\alpha, \alpha, \alpha$ -trifluoro-2,6-dinitro-N, N-dipropil-p-toluidina) é um ingrediente ativo de várias marcas comercializadas como: Teflan, Herbiflan, Trifluralin. Este é um herbicida seletivo, a base de dinitroanilina amplamente utilizado no mundo inteiro. São utilizados no controle de ervas daninhas em produção frutas, hortaliças e na produção de grãos como: Arroz, soja, girassol, milho e etc. (LIMA et al., 2010). Estudos com truta arco-íris, sunfish bluegill e bagres têm mostrado que o herbicida trifluralina apresenta efeito tóxico para essas espécies de peixes e outros organismos aquáticos (JOHNSON; FINLEY, 1980; MAYER; ELLERSIECK, 1986).

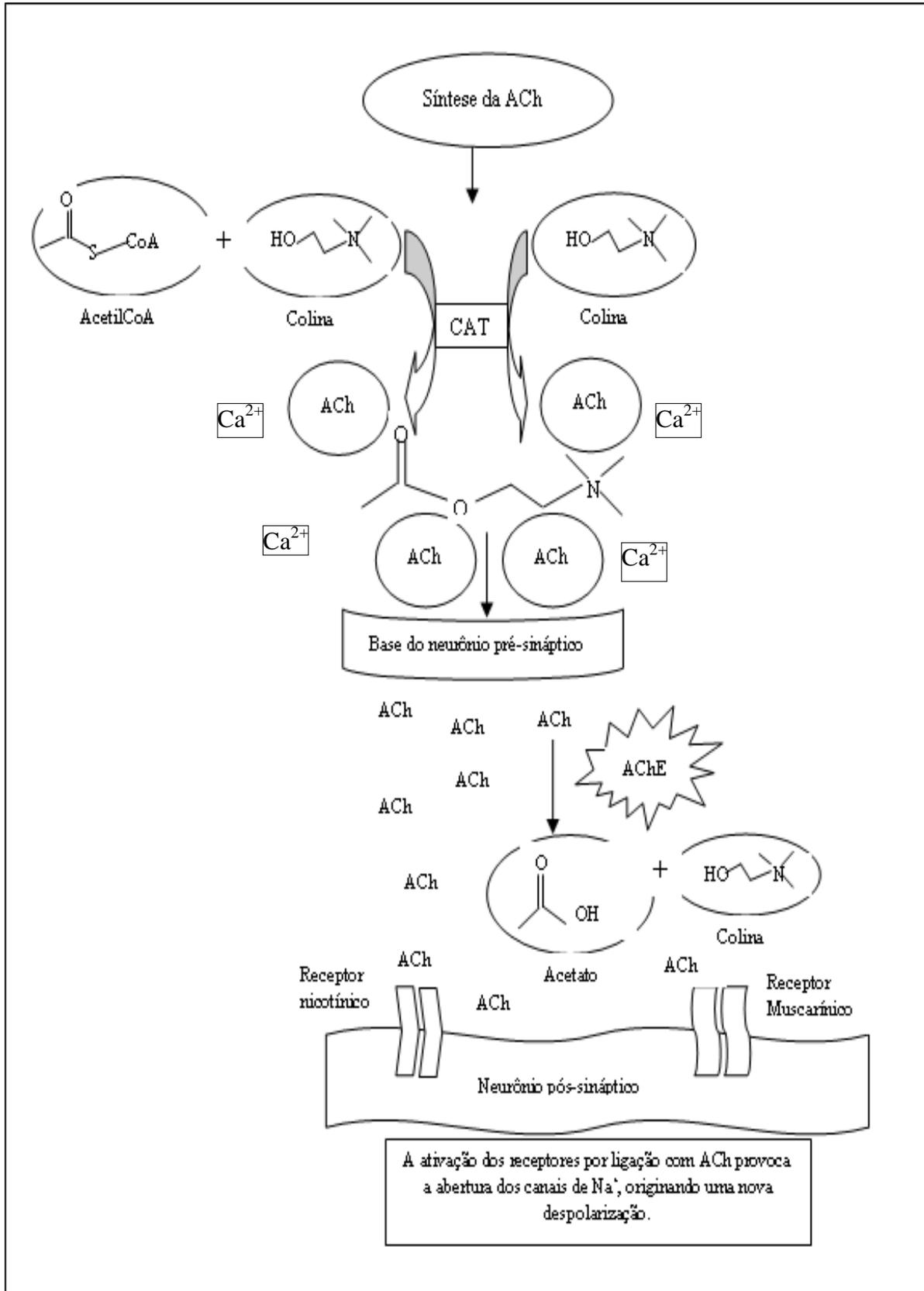
O estudo da inibição das colinesterases – ChE é importante tanto em estudos toxicológicos com medicamentos quanto agrotóxicos (KRAUT et al. 2000). A inibição da colinesterase é largamente utilizada como um biomarcador de efeito, devido à sua especificidade para os pesticidas organofosforados e carbamatos (ALPUCHE-GUAL et al.

2008). As colinesterases são membros da classe da serina-esterase que são enzimas presentes nos diversos tecidos colinérgicos e não colinérgicos, bem como no cérebro, plasma e outros fluidos corporais (MASSOULIÉ et al. 2008).

A síntese e liberação de acetilcolina - ACh acontece no interior da terminação nervosa a partir da colina e do grupo acetil do acetil-CoA que é hidrolisado pela enzima-chave, acetilcolintransferase à ACh. A maior parte da ACh sintetizada é armazenada em vesículas sinápticas, onde sua concentração é muito alta. A liberação das vesículas ocorre por exocitose desencadeada pela entrada de  $Ca^{2+}$  na terminação nervosa. Após sua liberação, a ACh difunde-se através da fenda sináptica e combina-se com os receptores situados na célula pós-sináptica. Parte da ACh perde-se no caminho ao ser hidrolisada pela acetilcolinesterase (AChE) em colina e ácido acético, esta enzima permanece ligada à membrana basal e também é encontrada entre as membranas pré e pós-sinápticas (**Figura 1**, pag. 32) (LEHNINGER, 2006).

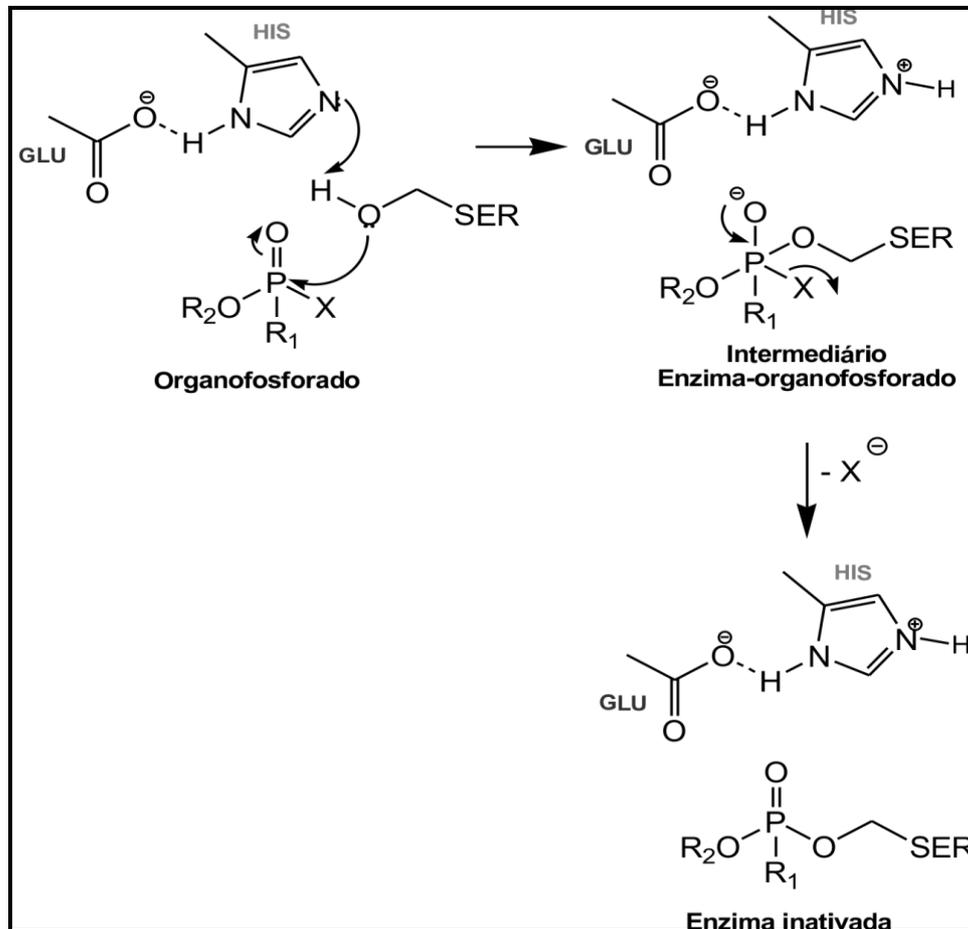
De acordo com a sua distribuição específica no tecido, especificidade de substrato, e a susceptibilidade de inibidores, as colinesterases são divididas em duas classes: acetilcolinesterase (AChE; acetil acetilcolina, EC 3.1.1.7) e butirilcolinesterase (BChE acylhydrolase acylcholine, EC 3.1.1.8). O mecanismo da reação de inibição da colinesterase por organofosforados e carbamatos envolve um ataque nucleofílico da serina da tríade catalítica (**Figura 2**, pag. 33) (DELFINO et al. 2009).

**Figura 1** - Esquema simplificado da sinapse colinérgica



Fonte: Autor desta tese, 2013.

**Figura 2** - Mecanismo geral de inibição da AChE, onde -X é o grupo de saída do agente organofosforado



Fonte: Petronilho et al., 2011.

Herbicidas como o clomazone (isooxazolidinone), quinclorac (quinolina), propanil (dichloropropionanilide) e metil metsulfuron (sulfoniluréia) também têm sido amplamente utilizados na agricultura, inclusive em campos de arroz no Sul do Brasil (RODRIGUES; ALMEIDA, 1998; JONSSON et al. 1998). Estudos têm demonstrado que a atividade da ChE no cérebro e músculo foi inibida por diversos herbicidas como clamazone isooxazolidinone (MIRON et al. 2005). A atividade da AChE em cérebro de *Leporinus obtusidens*, peixes teleósteos, diminuiu significativamente após exposição à clomazone e a herbicidas quinclorac (MORAES et al. 2007). O efeito inibitório de alguns organofosfatos e carbamatos sobre a acetilcolinesterase (AChE), da espécie *C. macropomum* também foi descrito por Assis et al. (2010).

O *C. macropomum* (Tambaqui) foi escolhido para este estudo por duas razões: a espécie tem sido intensamente cultivada em consórcio entre as plantações de arroz no delta do Rio São Francisco e estudos sobre os efeitos da exposição ao herbicida trifluralina sobre a colinesterase cerebral e muscular dessa espécie de peixe não foram encontrados. O objetivo principal deste estudo foi caracterizar *in vivo* e *in vitro* os efeitos da exposição ao herbicida trifluralina na atividade colinesterásica cerebral e muscular de *C. macropomum*, a fim de avaliar o potencial desta espécie como sentinela para a região do delta do Rio São Francisco e outros rios do Brasil.

## 4.2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.2.1. Produtos químicos

Os seguintes produtos químicos foram obtidos a partir da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO): 5,5-ditio-bis-nitrobenzóico (DTNB), iodeto de acetilcolina (ATCh), albumina de soro bovino, Triton X-100, fosfato de sódio, sódio dodecil sulfato (SDS), eserina (fisostigmina), DMSO (dimetilsulfóxido), ISO-OMPA (tetraisopropilo pyrophosphamide), herbicida trifluralina – teflan® que foi purificado ( $\alpha, \alpha, \alpha$ -trifluoro-2,6-dinitro-N, N-dipropil-p-toluidina) (**Figura 3**, pag. 34).

**Figura 3** - Estrutura química da trifluralina



Fonte: <http://en.wikipedia.org/wiki/Trifluralin>

#### 4.2.2. Purificação da Trifluralina (TRF)

O herbicida trifluralina foi extraído em funil de separação (30 mL) com acetato de etila (20 mL) e NaOH 10% (50 mL). A mistura foi homogeneizada e deixada em repouso até apresentar a separação da fase orgânica. Esta foi removida e transferida para um balão volumétrico de 250 mL adicionando-se 10 mL de etanol para remoção da água residual. Os solventes foram evaporados em rotavapor BUCHI461 Batch – tipo RE1115, até apresentar a formação de cristais alaranjados, com 98% de pureza (MELO, 2007). Esses cristais foram doados pelo Laboratório de Eletroquímica – UFAL para a realização do experimento.

#### 4.2.3. Animais

O *C. macropomum* (Tambaqui) é predominante no delta do rio São Francisco. A espécie tem valor econômico significativo para a produção intensiva de peixes (CODEVASF, 2006). Exemplos de *C. macropomum* (Família: Characidae, Ordem: Characiformes), sem qualquer exposição a agrotóxicos (peso de  $42,51 \pm 8,20$  g, com  $14,36 \pm 1,04$  cm de comprimento total) foram fornecidos pela Companhia Hidro Elétrica do São Francisco (CHESF) (**Figura 4**, pag. 35).

**Figura 4** - Tambaqui (*Colossoma macropomum*)



Fonte: Autor desta tese, 2011.

#### 4.2.4. Preparo do Teste Experimental

Os peixes cerca de 500 animais foram aclimatados às condições de laboratório durante 5 dias, em quatro tanques (250 L), contendo a água livre de herbicida antes do experimento. Eles foram mantidos em água com oxigênio constante em sistema estático com um fotoperíodo natural (12 h luz \ 12 h escuro). No período de aclimação, os peixes foram alimentados uma vez por dia com ração comercial para peixes (38 % de proteína bruta). Este modelo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alagoas (Processo N ° 024854 / 2010-11).

#### 4.2.5. Testes preliminares

Os testes preliminares foram realizados segundo as Normas Brasileiras 15088, a fim de determinar as faixas de concentração da trifluralina a serem utilizadas nos testes definitivos com *C. macropomum*. Cruzando informações de produtos comerciais quanto aos valores de CL<sub>50</sub> da trifluralina para outras espécies de peixes de 0,5 a 2,2 mg / L em 96 h de exposição (EPA, 1996).

#### 4.2.6. Teste de toxicidade *in vivo*

Após aclimação, os animais foram transferidos para 28 aquários de 70 L sob oxigenação individual, e as variáveis de qualidade da água foram monitorados. Grupos de 8 animais por aquário foram expostos a diferentes concentrações de trifluralina (0,74; 1,5; 2,23; 3,0 µmol/L) durante um período de 96 h. O valor da CL<sub>50</sub> da trifluralina foi determinado com base na média do percentual de mortalidade dos dois experimentos realizados. As soluções do herbicida trifluralina foram administradas através da água em condição estática, com quatro repetições cada. O número total de 192 exemplares usados no experimento foi determinado com base na sobrevivência remanescente de 95 % dos peixes que foram aclimatados às condições de laboratório. A trifluralina foi solubilizada em 1 % de dimetilsulfóxido (DMSO) com concentração final no aquário de 0,14 % DMSO. Dois controles foram estabelecidos sob as mesmas condições (controle de água e controle solvente - DMSO).

#### 4.2.7. Variáveis de qualidade da água

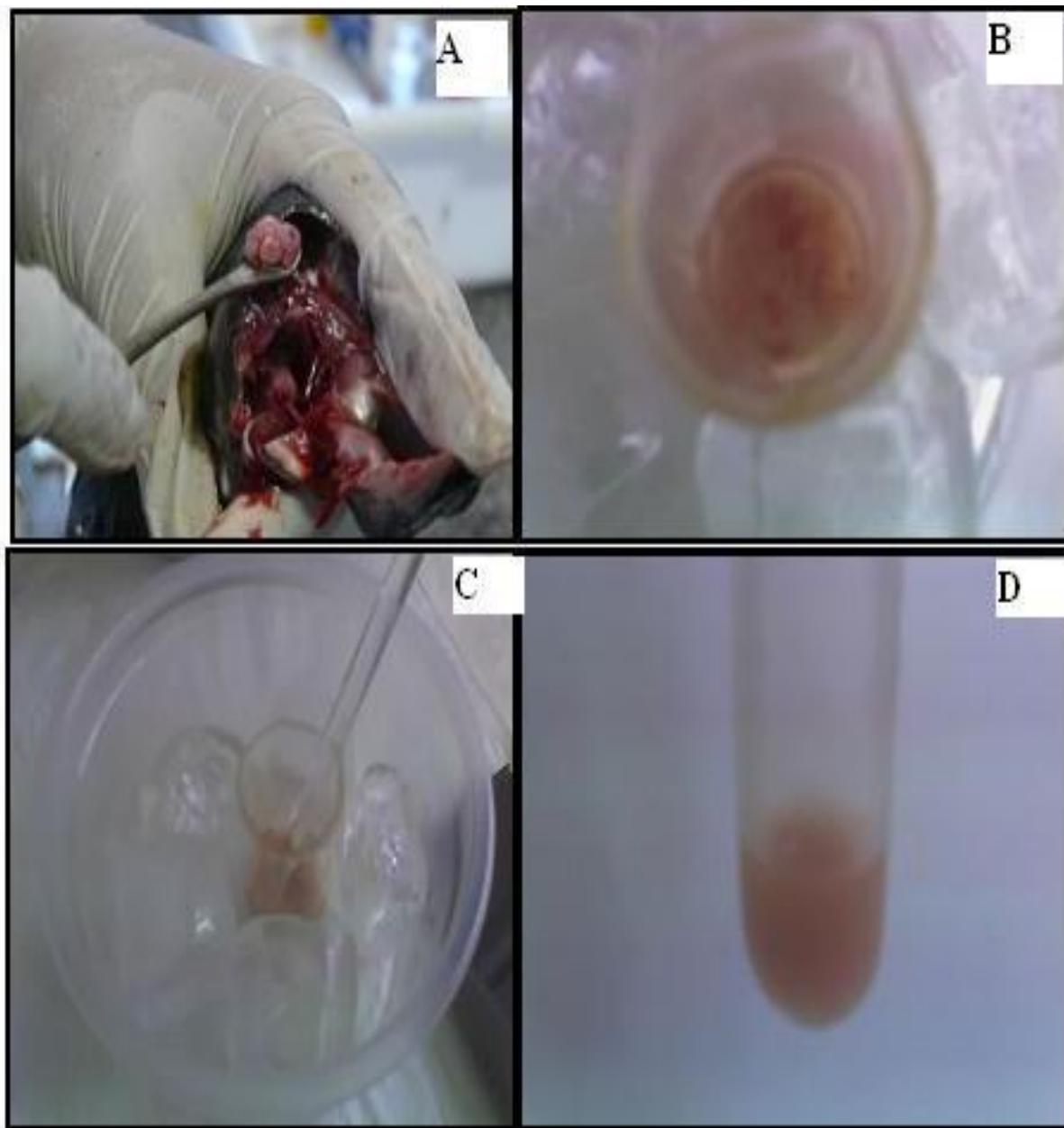
Os parâmetros de qualidade da água do aquário, tais como pH, temperatura (°C) e oxigênio dissolvido (mg / L) foram medidos e registrados a cada 24 horas (ABNT, 1993). Os animais contaminados e os controles não foram alimentados durante o tempo de exposição. Após o tempo de exposição, os animais foram capturados e colocados em banho de gelo para serem abatidos e decaptados. Em seguida, foi feita uma incisão no crânio e os cérebros foram removidos, pesados, etiquetados e embalados em papel alumínio. Os cérebros foram então colocados em nitrogênio líquido e depois em freezer -20°C até a análise.

#### 4.2.8. Preparação do extrato cerebral e muscular

Para preparar o homogenato de células um pool de três cérebros foram pesados em béquer de vidro e adicionado uma solução de NaCl a 0,9% na proporção de 80 mg de cérebro / 1 mL. Em seguida macerados em homogenizador de vidro, submerso em banho de gelo. Após a preparação do extrato, este foi sonificado, em Fisher Scientific Modelo da Sonic Dismembrador 100, com uma programação de três ciclos de 15 s com 15 s de descanso em gelo (**Figura 5**, pag.38). Para o tecido muscular foi pesado 1 mg de filé e também foi utilizado a relação 80 mg / 1 mL de solução de NaCl a 0,9 % macerado em homogenizador de vidro e sonificado. O homogenato foi centrifugado por 15 min em 3000 x g a 5 °C e o sobrenadante foi usado como fonte de enzima, metodologia adaptada de Golombieski et al. (2008) (**Figura 6**, pag. 39).

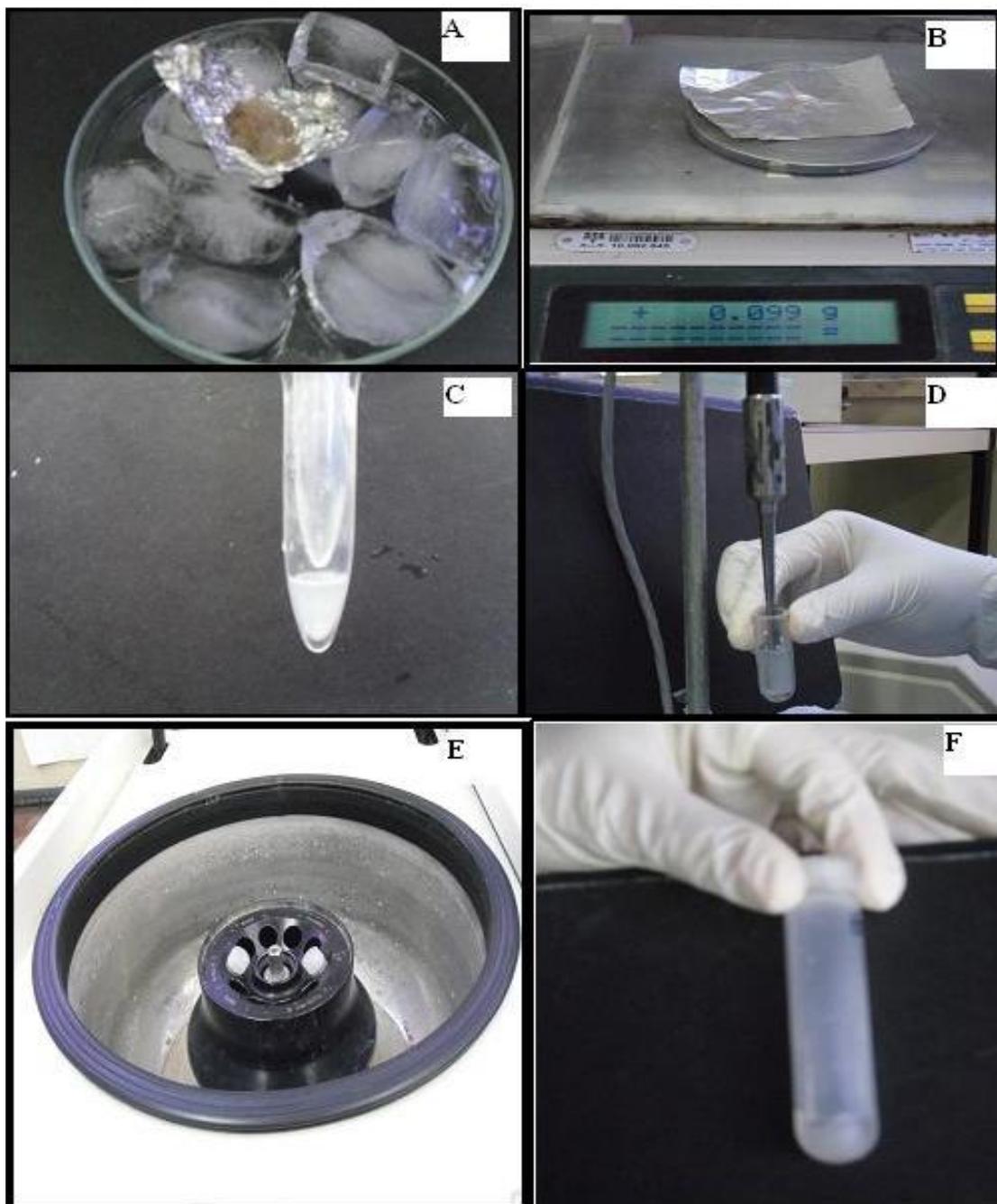
Este procedimento foi realizado nos cérebros e músculos dos animais expostos ao herbicida trifluralina, bem como nos animais dos controles. Em seguida, o homogenato de células de cérebro e o sobrenadante do tecido muscular foi utilizado para determinar a atividade da enzima colinesterase e quantificação da proteína total.

**Figura 5** - Preparação do homogenato de células, A-Extração do cérebro, B-Pesagem do cérebro em balança analítica, C-Maceração, D-Extrato Bruto.



Fonte: Autor desta tese, 2011.

**Figura 6** - Preparação do sobrenadante de células, A- Descongelamento do músculo, B- Pesagem do músculo em balança analítica, C- Maceração, D- Produção do homogenato, E- Centrifugação, F- Sobrenadante.



Fonte: Autor desta tese, 2013.

#### 4.2.9. Determinação da atividade da ChE

Foi determinada a atividade da ChE cerebral e muscular no homogenato e sobrenadante de células recém preparado, com a análise em temperatura ambiente (25-28 °C) de acordo com a metodologia de Ellman et al. (1961) a um comprimento de onda de 412 nm num espectrofotômetro UV / VIS (Perkin Elmer UV / VIS Lambda 2). O ensaio foi realizado em uma mistura de reação contendo 3 mL de 0,1 M de tampão de fosfato de potássio, pH 8,0, 0,34 mM de 5,5-ditio-bis-nitrobenzólico (DTNB), 0,5 mM de iodeto de acetiltiocolina (ATCh) como substrato, e 100 µL da diluição do homogenato de cérebro ou do sobrenadante do homogenato muscular. Para o branco, 20 µL de água desmineralizada foram adicionados em substituição ao substrato ATCh. O tempo de reação foi de 5 min, e todos os ensaios foram realizados em três repetições. Uma unidade de atividade da ChE representa a quantidade de enzima que catalisa a hidrólise de um µmol de substrato por minuto ( $U = \mu\text{mol}/\text{min}$ ).

A atividade da enzima foi calculada de acordo com:

$$\text{Eq. (1)} \quad U/\text{mL} = \frac{\Delta A/\Delta t}{\epsilon \cdot \lambda} \times \frac{V}{V_e \cdot D}$$

Onde: V é o volume total da mistura da reação na cuveta,  $\Delta A / \Delta t$  é a velocidade de reação (variação de absorvância em função do tempo),  $\epsilon$  é o coeficiente de extinção molar do 5,5-ditio-bis-aminobenzólico DTNB em 412 nm (14,15 mmol / L / cm),  $\lambda$  é o comprimento da cuveta (1 cm),  $V_e$  representa o volume do extrato enzimático e D é o fator de diluição. A atividade específica foi expressa em µmol de substrato / min / mg do teor de proteína total.

#### 4.2.10. O teor de proteínas

A concentração de proteína total do homogenato foi determinada em espectrofotômetro em 595 nm, de acordo com Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino como padrão, para a curva de calibração. Todos os ensaios foram realizados em três repetições.

#### 4.2.11. Ensaio cinético

O ensaio cinético foi determinado por afinidade pelo substrato ( $K_m^{app}$ ) e velocidade máxima da reação ( $V_{max}^{app}$ ) com diferentes concentrações do substrato iodeto de acetilcolina - ATCh no intervalo de 0,00624 - 4 mmol / L. A constante aparente de Michaelis-Menten ( $K_m^{app}$ ) foi avaliada por uma curva de regressão não linear, mostrando variação na velocidade inicial para as concentrações de substrato, as medições foram efetuadas em três repetições e expressas em atividade específica.

Para a obtenção da constante ( $K_m^{app}$ ) e a velocidade máxima ( $V_{max}^{app}$ ) da colinesterase foi utilizado o programa GraphPad Prism. Versão 5 para o Windows (GraphPad Software).

#### 4.2.12. Inibição enzimática *in vitro*

Estudos de inibição foram realizados de acordo com Tortelli et al. (2006) utilizando o carbamato de eserina como referência de inibição positiva para a atividade da ChE, o herbicida trifluralina foi utilizado para identificar a concentração inibitória da atividade da ChE cerebral ( $CI_{50}$ ). Para cada inibidor utilizado foram preparadas soluções-estoque em 0,1 % de dimetilsulfóxido (DMSO). Os extratos celulares a partir de três cérebros do controle água foram preparados. O homogenato de células foi incubado durante 20 minutos com diferentes concentrações de inibidor que variaram de 0,05 a 10  $\mu$ mol / L para o carbamato de eserina, e 0,075 a 9  $\mu$ mol / L para o herbicida trifluralina. Ensaio preliminares de inibição com três concentrações de tetraisopropilo pyrophosphamide (iso-OMPA) (0,05; 0,1 e 0,2  $\mu$ mol / L) também foram realizados. A atividade da ChE remanescente foi medida em presença de iodeto de acetilcolina (ATCh). O  $CI_{50}$  (concentração que causa uma inibição de 50%) foi calculado a partir da concentração do inibidor vs percentual de inibição da atividade da ChE utilizando GraphPad Prism versão 5 para Windows (GraphPad Software).

#### 4.2.13. Eletroforese

A eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) foi realizada como descrito por Laemmli (1970), utilizando um gel de poliacrilamida a 8,0 %, e 5 mM de ditioneitol (DTT). Para uma estimativa preliminar da massa molecular foi usado o marcador da Invitrogen LC 5677. Com objetivo de realizar um zimograma, foi corrido um gel Nativa-PAGE 8,0 % de poliacrilamida em condições não redutoras. O zimograma foi realizado de acordo com o procedimento descrito por Sagane et al. (2005). Para tal foi preparado uma solução contendo 6 mM ATCh e 3 mM de DTNB em tampão fosfato 100 mM, pH 7,0 (ELLMAN et al. 1961). Após a eletroforese, o gel da nativa-PAGE foi imerso na solução contendo os reagentes da metodologia de Ellman e mantido sob agitação a temperatura ambiente, até que as bandas coloridas foram visualizadas.

#### 4.2.14. As análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK) ao nível de significância de 5 % de probabilidade e expressos em média  $\pm$  desvio padrão. A análise do probit foi usada para calcular a concentração letal (CL<sub>50</sub>). A concentração inibitória (CI<sub>50</sub>) foi calculado a partir da concentração do inibidor vs percentual de inibição da atividade da ChE, utilizando GraphPad Prism versão 5 para Windows® (GraphPad Software) e o software SAEG® versão 9,0.

### 4.3. RESULTADOS

#### 4.3.1. Teste toxicológico *in vivo*

Variáveis físico-químicas de qualidade da água no teste de toxicidade aguda com o *C. macropomum* (Tambaqui) descritas na **Tabela 1** mantiveram-se constantes em todos os tratamentos e ao longo do experimento.

**Tabela 1** - As variáveis físico-químicas de qualidade da água no teste de toxicidade aguda do herbicida trifluralina com o *C. macropomum* (Tambaqui)

Concentração (µmoles/L)	pH	OD (mg/L)	T°C
Controle água	7,4	7,0	23,3
Controle DMSO	7,6	7,5	23,4
0,74	7,7	6,6	26,3
1,5	6,4	7,3	27,1
2,23	7,0	7,5	27,9
3,0	7,0	7,0	27,8

O valor da toxicidade aguda para o herbicida trifluralina em peixes juvenis de *C. macropomum* (Tambaqui) foi avaliado pela mortalidade de 50 % dos animais no experimento com a determinação da CL<sub>50</sub> 96 h sendo de 1,25 µmol / L, que corresponde 0,42 mg/L com um intervalo de confiança de 95 % de 1,22 - 1,71 µmol / L (**Tabela 2**, pag. 43).

**Tabela 2** – Determinação da concentração letal do herbicida trifluralina em µmol/L para juvenis de *C. macropomum* (Tambaqui) \*

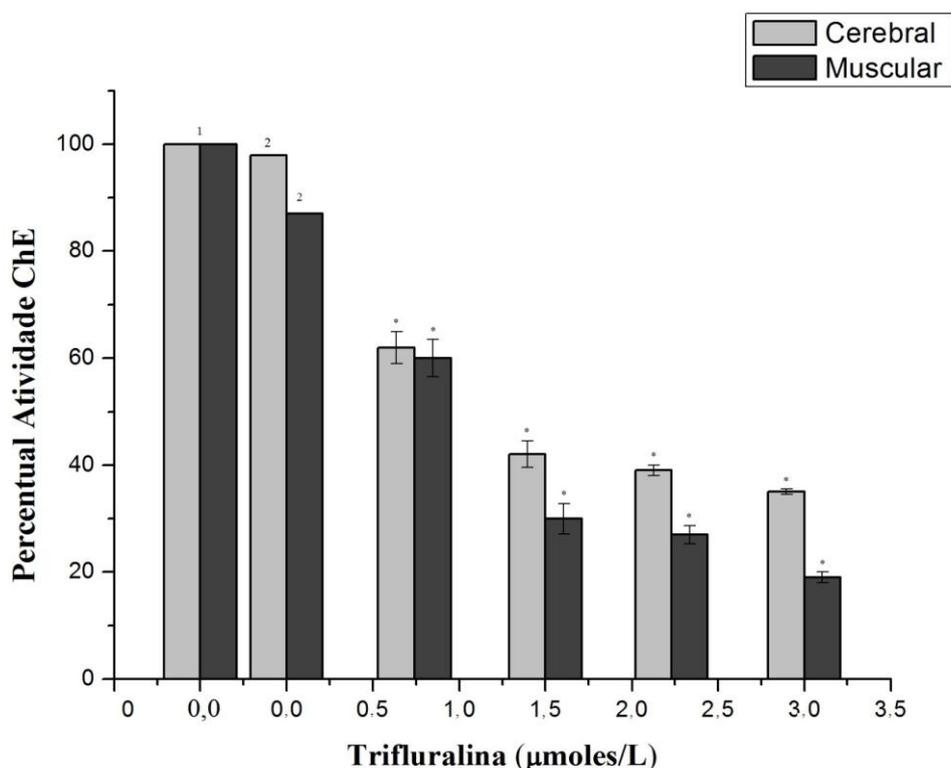
CL <sub>10</sub> Intervalo de Confiança (95%)	CL <sub>50</sub> Intervalo de Confiança (95%)	CL <sub>90</sub> Intervalo de Confiança (95%)
0,43 (0,37 ± 0,48)	1,25 (1,22 ± 1,71)	4,58 (3,34 ± 7,29)

\*Análises realizadas pelo Probit do SAEG.

Após a exposição ao herbicida trifluralina a atividade colinesterásica - ChE cerebral e muscular foi analisada para todos os tratamentos. Os resultados mostraram efeito dose-dependente com diminuição significativa da atividade ChE ( $p < 0,05$ ) em relação aos controles água e solvente.

A atividade colinesterásica do homogenato de células do cérebro do controle apresentou maior atividade comparada com a atividade colinesterásica do músculo do controle sendo de 2,276 a 0,7067 µmol/min.mL (**Tabela 3**, pag.45). A atividade ChE do cérebro dos peixes expostos ao herbicida trifluralina apresentou uma redução da atividade que

variou de 37 %, em 0,74  $\mu\text{mol} / \text{L}$  até 62 % em 3,0  $\mu\text{mol} / \text{L}$ . O mesmo comportamento inibitório foi observado na atividade da ChE muscular, com inibição em torno de 13 % em 0,74  $\mu\text{mol} / \text{L}$  até 80 % em 3,0  $\mu\text{mol} / \text{L}$  (Figura 7, pag. 44).



**Figura 7** - Percentagem da atividade ChE cerebral e muscular em diferentes concentrações do herbicida trifluralina para juvenis de *Colossoma macropomum* (Tambaqui) *in vivo*. 1-Controle água, 2-Controle solvente. Os dados são apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão das repetições. Diferença significativa do controle é indicada por \* ( $P < 0,05$ ).

A **tabela 3**, pag. 45, mostra os valores do teor de proteína, atividade total e específica da ChE após 96 h de exposição ao herbicida trifluralina de ambos os tecidos. O teor de proteína no cérebro mostrou uma diminuição significativa durante a exposição ao herbicida trifluralina.

Comparando-se o teor de proteína do homogenato de cérebro de peixe do controle solvente com o valor obtido do controle água, o controle solvente mostrou uma queda de aproximadamente 86 %. Uma vez que os valores de atividade da ChE obtidos para os dois controles não mostraram variação significativa, a diminuição do teor de proteína contribuiu para o aumento dos valores de atividade específica. O aumento da concentração de trifluralina também contribuiu para uma queda significativa no conteúdo proteico. Comparando-se o teor

de proteína do controle água e solvente com o teor de proteína obtido nos peixes expostos a 3,0  $\mu\text{mol} / \text{L}$  do herbicida trifluralina, verificou-se uma diminuição de 96 % e 73 %, respectivamente.

**Tabela 3** - Variação do teor de proteína, atividade ChE e atividade específica no cérebro e músculo do *Colossoma macropomum* (Tambaqui) após 96 h em exposição *in vivo* a trifluralina

<b>Tratamentos</b>	<b>Peso do Cérebro (mg)</b>	<b>Proteína (mg/mL)</b>	<b>Atividade total (<math>\mu\text{moles}/\text{min.mL}</math>)</b>	<b>Atividade específica (<math>\mu\text{moles}/\text{min.mL}/\text{mg Proteína}</math>)</b>
<b>Cérebro</b>				
<b>Controle água</b>	0,260 $\pm$ 0,051	7,620 $\pm$ 0,291 <sup>a</sup>	2,276 $\pm$ 0,101 <sup>a</sup>	0,298 $\pm$ 0,052 <sup>a</sup>
<b>Controle solvente</b>	0,220 $\pm$ 0,030	1,027 $\pm$ 0,070 <sup>b</sup>	2,148 $\pm$ 0,180 <sup>ab</sup>	2,091 $\pm$ 0,041 <sup>b</sup>
<b>TRF 0,74 <math>\mu\text{M}</math></b>	0,221 $\pm$ 0,031	0,713 $\pm$ 0,010 <sup>bc</sup>	1,417 $\pm$ 0,252 <sup>bc</sup>	1,987 $\pm$ 0,322 <sup>bc</sup>
<b>TRF 1,5 <math>\mu\text{M}</math></b>	0,251 $\pm$ 0,072	0,587 $\pm$ 0,052 <sup>cd</sup>	0,978 $\pm$ 0,061 <sup>c</sup>	1,666 $\pm$ 0,071 <sup>c</sup>
<b>TRF 2,23 <math>\mu\text{M}</math></b>	0,220 $\pm$ 0,050	0,634 $\pm$ 0,031 <sup>c</sup>	0,892 $\pm$ 0,010 <sup>c</sup>	1,406 $\pm$ 0,060 <sup>d</sup>
<b>TRF 3 <math>\mu\text{M}</math></b>	0,270 $\pm$ 0,043	0,271 $\pm$ 0,002 <sup>d</sup>	0,812 $\pm$ 0,041 <sup>c</sup>	2,996 $\pm$ 0,161 <sup>e</sup>
<b>Músculo</b>				
<b>Controle água</b>	0,098 $\pm$ 0,040	3,441 $\pm$ 0,060 <sup>a</sup>	0,706 $\pm$ 0,320 <sup>a</sup>	0,205 $\pm$ 0,090 <sup>a</sup>
<b>Controle solvente</b>	0,099 $\pm$ 0,020	1,820 $\pm$ 0,061 <sup>b</sup>	0,618 $\pm$ 0,285 <sup>ab</sup>	0,339 $\pm$ 0,135 <sup>b</sup>
<b>TRF 0,74 <math>\mu\text{M}</math></b>	0,093 $\pm$ 0,012	1,200 $\pm$ 0,043 <sup>b</sup>	0,424 $\pm$ 0,094 <sup>ab</sup>	0,353 $\pm$ 0,121 <sup>b</sup>
<b>TRF 1,5 <math>\mu\text{M}</math></b>	0,096 $\pm$ 0,032	1,180 $\pm$ 0,017 <sup>b</sup>	0,215 $\pm$ 0,010 <sup>b</sup>	0,182 $\pm$ 0,068 <sup>bc</sup>
<b>TRF 2,23 <math>\mu\text{M}</math></b>	0,100 $\pm$ 0,081	0,800 $\pm$ 0,018 <sup>c</sup>	0,197 $\pm$ 0,006 <sup>b</sup>	0,246 $\pm$ 0,114 <sup>c</sup>
<b>TRF 3 <math>\mu\text{M}</math></b>	0,099 $\pm$ 0,060	0,492 $\pm$ 0,019 <sup>c</sup>	0,137 $\pm$ 0,074 <sup>b</sup>	0,278 $\pm$ 0,064 <sup>c</sup>

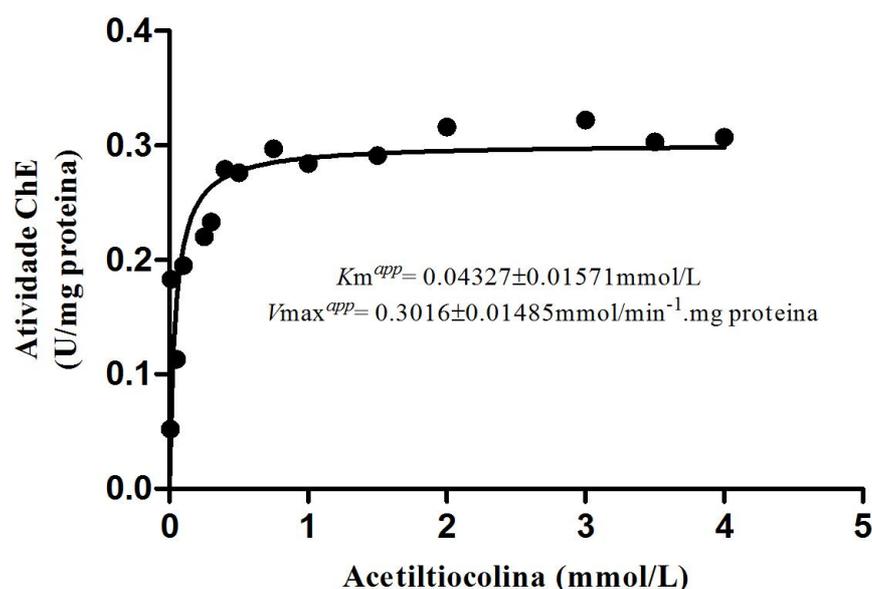
<sup>a</sup> Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos comparados com o controle água, os dados são apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão das repetições. A análise estatística utilizada foi ANOVA seguido do teste de SNK \*( $p < 0,05$ ).

Os efeitos observados na quantificação da proteína da ChE muscular foram semelhantes aos encontrados na proteína cerebral. Porém, na análise dos controles foi observada uma diminuição na quantidade de proteína do controle solvente em torno de 47 %, comparado com o controle água. As concentrações de trifluralina dos tratamentos também contribuíram para uma diminuição significativa na quantidade de proteína do músculo ( $p < 0,05$ ). Comparando a quantidade de proteína determinada na maior concentração de trifluralina com os controles água e solvente, observou-se uma diminuição de 86 % com o controle água e 73 % com o controle solvente.

A inibição da ChE observada com o herbicida levou a um acúmulo de acetilcolina, causando super estimulação dos receptores nicotínicos e muscarínicos. Assim, a inibição da ChE influenciou o processo de neurotransmissão colinérgica promovendo efeitos indesejáveis. Como os receptores são de natureza protéica podem também ter sofrido efeito potencial não só do herbicida, mas também do solvente utilizado pois foram observadas alterações de comportamento nos peixes expostos ao herbicida, tais como natação errática, letargia e paralisia opercular (Dados não apresentados).

#### 4.3.2. Parâmetros cinéticos ChE e de exposição *in vitro*

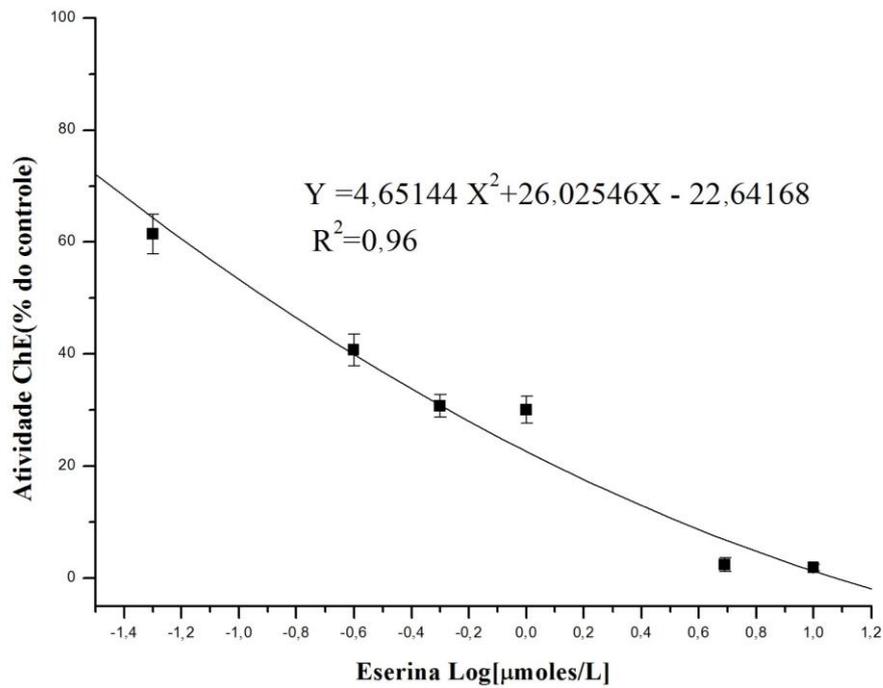
Como mostrado na **Figura 8**, pag.47, uma cinética de Michaelis Menten foi observada na reação do homogenato de células de cérebro recém preparado com acetiltiocolina como substrato. Assim, houve a importância de determinar-se a caracterização bioquímica da presente ChE na espécie e no tecido estudado antes da sua utilização como biomarcador. Pois os valores das constantes aparentes de Michaelis Menten ( $K_m^{app}$  e  $V_{max}^{app}$ ) para a ChE cerebral de *C. macropomum* foram ( $0,0432 \pm 0,0157$  mmol / L) e ( $0,3016 \pm 0,0148$  mmol. min<sup>-1</sup>. mgP), respectivamente. Como mais de uma ChE podem estar presentes nos tecidos de peixes, está pode apresentar diferentes sensibilidades da ChE a agentes anti-colinesterásicos.



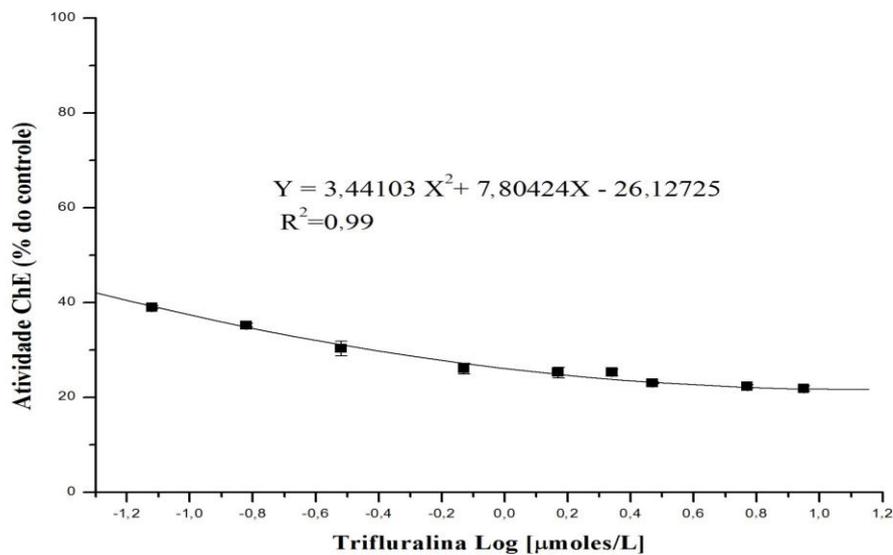
**Figura 8** – Gráfico da cinética de Michaelis-Menten para a atividade ChE cerebral de *C. macropomum* (Tambaqui) na presença de acetilcolina, como substrato. Os dados são apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão de três repetições. ChE: Colinesterase.

Os resultados dos ensaios de inibição da ChE cerebral são apresentados na **figura 9 e 10**, pag. 48, O valor da  $CI_{50}$  em exposição *in vitro* para o carbamato de eserina foi de 0,158  $\mu\text{mol} / \text{L}$ , com um intervalo de confiança de 95 %. No entanto, a ChE cerebral de *C. macropomum* foi menos sensível a trifluralina tendo um  $CI_{50}$  de 2,34  $\mu\text{mol} / \text{L}$ , com um intervalo de confiança de 95 %. Contudo, as propriedades da ChE podem diferir entre as espécies e podem também exibir variações em diferentes tecidos da mesma espécie. Os ensaios preliminares com três concentrações de Iso-OMPA (0,05, 0,1 e 0,2  $\mu\text{mol} / \text{L}$ ) mostraram uma redução de 14, 29 e 33 % na atividade da colinesterase, respectivamente, que ajudou para observar a presença de BChE no cérebro de *C. macropomum*.

A **Tabela 4**, pag. 48, apresenta a comparação das constantes aparentes cinéticas e valores estimados de  $CI_{50}$  para o carbamato de eserina. O valor da concentração inibitória de 50 % da atividade da ChE indica o nível de sensibilidade das diferentes espécies de peixes a inibidores da colinesterase.



**Figura 9** - Efeito de diferentes concentrações do carbamato de eserina sobre atividade ChE a partir do homogenato de célula do cérebro de juvenis de *Colossoma macropomum* (Tambaqui). Os dados são expressos como a média ± desvio padrão de três repetições.



**Figura 10** - Efeito de diferentes concentrações do herbicida trifluralina sobre atividade ChE a partir do homogenato de célula do cérebro de juvenis de Tambaqui (*Colossoma macropomum*). Os dados são expressos como a média ± desvio padrão de três repetições.

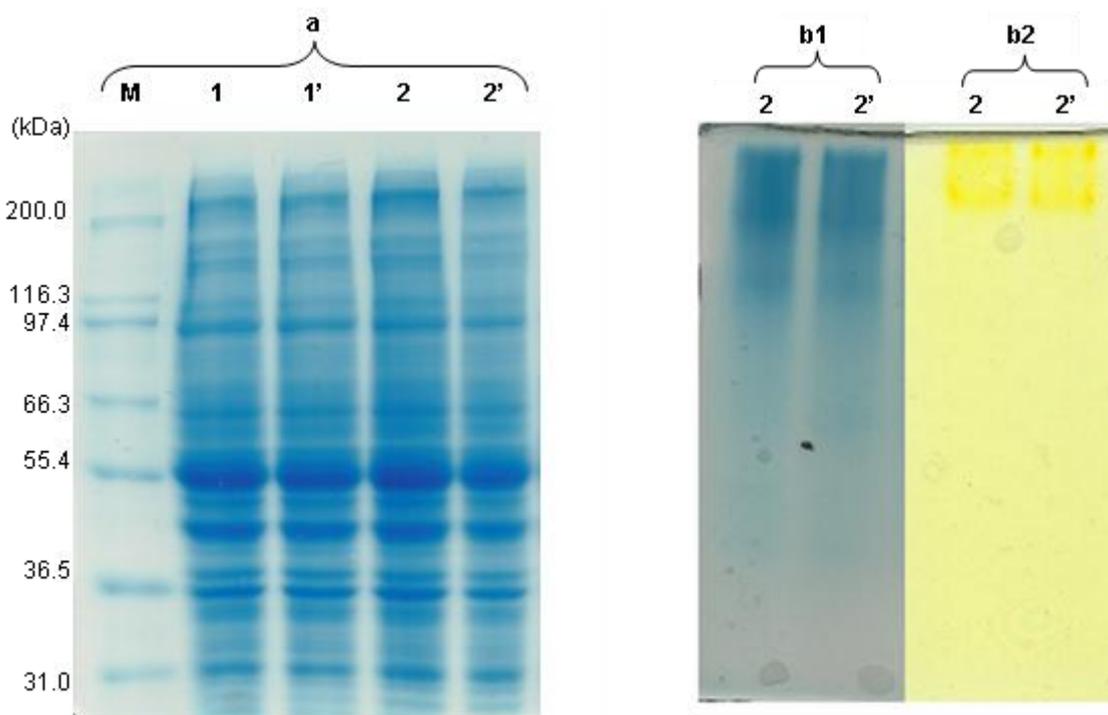
**Tabela 4** - Comparação das constantes de Michaelis Menten ( $K_m^{app}$ ), velocidade máxima ( $V_{max}^{app}$ ) e os valores de  $CI_{50}$  da colinesterase cerebral de diferentes espécies de peixes utilizando o carbamato de eserina.

Nomes comum	Peixes	$K_m^{app}$ (mmol / L)	$V_{max}^{app}$ ( $\mu\text{mol} / \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ protein)	$CI_{50}$ (mmol / L)	Referência
Tambaqui	<i>Colossoma macropomum</i>	0,043	0,301	$1,58 \times 10^{-4}$	Presente trabalho
Peixe rei	<i>Odontesthes bonaerensis</i>	0,040	0,260	$7,43 \times 10^{-3}$	Monserrat; Biachini, 2001
Biquara	<i>Haemulon plumieri</i>	0,310	0,238	$6,4 \times 10^{-7}$	Alpuche-Gual et al., 2008
Tilápia do Nilo	<i>Oreochromis niloticus</i>	0,102	0,229	$9,76 \times 10^{-1}$	Rodrigues-Fuentes; Gold-Bouchot 2004
Carpa	<i>Cyprinus carpio</i>	0,230	0,482	$5,0 \times 10^{-4}$	La Torre et al. 2002
Guaru	<i>Cnesterodon decemmaculatus</i>	0,170	0,465	$1,43 \times 10^{-3}$	La Torre et al. 2002
Enguia	<i>Anguilla anguilla</i>	0,310	0,040	$4,22 \times 10^{-6}$	Valbonesi et al. 2011
Bagre marinho	<i>Cathorops spixii</i>	0,196	0,021	$7,7 \times 10^{-5}$	Tortelli et al. 2006
Pescada	<i>Micropogonias furnieri</i>	0,201	0,019	$4,47 \times 10^{-3}$	Tortelli et al. 2006

#### 4.3.3. Eletroforese

A SDS-PAGE (8% de poliacrilamida) dos géis na presença de ditioneitol (DTT) mostrou que o homogenato de células de cérebro de *C. macropomum* (Tambaqui) tem um perfil semelhante de um extrato bruto que apresentou bandas características com peso molecular da AChE semelhante às bandas referidas na literatura para peixes em torno de 55,4 kDa com bandas de intensa visualização (Fig. 11a). Visto a possibilidade de encontrar as

bandas da AChE e BChE no homogenato de cérebro de *C.macropomum* (Tambaqui), foi realizada uma Nativa Page corada com Coomassie na Fig. 11b1, que revelou duas bandas difusas na mesma área indicada pelas bandas coloridas no zimograma usando iodeto de acetilticolina como substrato (ATCh) e DTNB (Fig. 11b2). Assim, como revelado na eletroforese nativa e na análise de inibição da colinesterase de cérebro de Tambaqui com inibidor específico iso-OMPA da BChE, indicou-se a possível presença das duas colinesterase AChE e a BChE no cérebro de *C.macropomum* (Tambaqui).



**Figura 11** - Análise SDS-PAGE e Nativa-PAGE com zimograma do homogenato de células do cérebro da ChE de juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*).

- a. SDS-PAGE (8%) na presença de DTT e corados com Coomassie. Marcador molecular Invitrogen LC 5677 e nas Linhas 1 e 1' (50 µg de proteína). Linhas 2 e 2' (90 µg de proteína).
- b. Nativa-PAGE (8%) do homogenato de célula do cérebro da ChE de juvenil Tambaqui (*Colossoma macropomum*) (90 µg de proteína) corado com Coomassie Brilhante Blue (CBB) e zimograma; b1- corado com CBB, b2- corado com DTNB e ATCh.

#### 4.4. DISCUSSÃO

Neste estudo, o valor da CL<sub>50</sub> 96 h de trifluralina foi de 1,25 µmol / L, correspondendo 0,42 mg / L, evidenciando uma resistência moderada de juvenis de *C. macropomum* a este herbicida. A exposição da trifluralina foi também avaliada para *Oncorhynchus mykiss* (valor

CL<sub>50</sub> 96 h de 0,21 mg / L) e *Cyprinus carpio* (CL<sub>50</sub> 48 h de 1,0 mg / L) (GANGOLLI, 1999). Esses autores mostraram que *C. macropomum* e *Cyprinus carpio* demonstraram uma resistência comparável ao herbicida trifluralina enquanto *Oncorhynchus mykiss* (Truta arco-iris) tem alta sensibilidade a este herbicida.

Os resultados dos ensaios toxicológicos mostram que o efeito inibitório do herbicida trifluralina sobre a ChE cerebral de juvenis de *C. macropomum* apresentou uma resposta dose-dependente (**Figura 7**, pag. 44). Mais de 30 % de inibição da ChE cerebral foi obtida na menor concentração (0,74 µmol / L) e 62 % de inibição na maior concentração (3,0 µmol / L). O efeito inibidor sobre a atividade da ChE foi também relatado para outros herbicidas como o glifosato, diclorvos, clamazone e diazon. Na ChE cerebral de *Leporinus obtusidens* (Piau verdadeiro), o glifosato causa um efeito inibitório da ChE de 17 % e 42 % nas concentrações de 3 mg / L e 20 mg / L, respectivamente (GLUSCZAR et al. 2006). Uma diminuição de 12 % (11,15 mg / L) foi encontrada na ChE cerebral de *Anguilla anguilla* exposto ao molinato (SANCHO et al. 2000). A exposição a uma concentração de 10 mg / L de Clamazone foi capaz de inibir 83 % da ChE no cérebro de bagre (MIRON et al. 2005). O Diazon teve um maior efeito inibitório sobre a enguia europeia 75 % com uma exposição de 0,042 mg / L (CERÓN et al. 1996). Diclorvos também apresentou um efeito inibitório considerável (35 % a 0,125 mg / L) na ChE do cérebro de robalo europeu (VARO et al. 2003). Um nível de inibição de 20 % da ChE é considerado como indicação da exposição a produtos agroquímicos em peixes, aves e invertebrados (MAYER; ELLERSIECK, 1986), embora algumas espécies sobrevivam a 50 % de inibição da ChE (VARO et al. 2003). Outros fatores como espécie, idade e sexo também podem influenciar o grau de inibição da ChE (BRETAUD et al. 2000; GOLOMBIESKI et al. 2008; CHUIKO et al. 2003).

A ChE cerebral foi mais sensível em baixas concentrações do herbicida trifluralina do que a ChE muscular, no entanto altas concentrações desse herbicida causam elevada redução da atividade ChE muscular em torno de 80%. Embora existam controvérsias na literatura a respeito da faixa de inibição da AChE necessária para causar a morte de animais aquáticos, a maioria das estimativas encontram-se na faixa de 70-85%. Possivelmente a faixa de inibição da ChE que tenha em maior percentual a AChE, esta dependente da espécie e do tipo de tecido examinado (BRETAUD et al. 2000).

Esses dados sugeriram que a inibição da AChE muscular é o fator mais importante na mortalidade de peixes expostos ao herbicida trifluralina. A perda do controle muscular pode causar múltiplos problemas para os peixes, incluindo natação errática, letargia e paralisia

opercular (PERKINS; SCHLENK, 2000). Existe uma variação de sensibilidade da colinesterase aos herbicidas e pesticidas entre os peixes neotropicais (MIRON et al. 2008).

As formulações comerciais de herbicidas contêm solventes, tensoativos para melhorar a solubilidade e aumentar a absorção pelas plantas. Ingredientes inertes ou solventes podem também induzir respostas biológicas muito maiores do que se espera (BRAND; MUELLER, 2002). Devido as suas propriedades fisicoquímicas, o dimetilsulfóxido-DMSO é considerado um solvente comum e as concentrações a cerca de 0,1 % a 5 % (v/v) de DMSO são frequentemente utilizadas. Contudo, alterações nas propriedades da proteína na presença de DMSO foram identificadas por TJERNBERG et al. (2006). Mesmo sob baixas concentrações, DMSO pode impactar a estabilidade de proteínas e alterar suas propriedades de ligação (TJERNBERG et al. 2006). A grande queda no teor de proteína observada na (Tabela 3, pag. 45) está relacionada com DMSO, que foi utilizado como co-solvente para a trifluralina. Um efeito similar foi também encontrado em outros experimentos em ensaios utilizando DMSO 2,5 % (YANG et al. 2004).

A trifluralina também mostrou uma clara influência sobre os valores de proteína do cérebro e músculo de *C. macropomum* (Tambaqui) após 96 horas de exposição. Embora a concentração de DMSO utilizada como solvente no ensaio toxicológico tenha influenciado a queda do teor de proteína de ambos os tecidos, não influenciou significativamente os valores de atividade da ChE. Por conseguinte, a diminuição da atividade ChE no cérebro *C. macropomum* está diretamente relacionada com às concentrações do herbicida trifluralina.

A **figura 8**, pag. 47, mostra que a atividade da ChE presente no homogenato de cérebro de Tambaqui (*C. macropomum*) recém preparado, apresenta um comportamento cinético da equação de Michaelis-Menten, na presença de acetiltiocolina (0,00624 - 4 mM). Assis e colaboradores trabalharam com sobrenadantes dos cérebros de

*C. macropomum* extraídos previamente e preparados com 0,5 mol / L de Tris-HCl, pH 8,0 e congelados a -20 °C antes de serem analisados (ASSIS et al. 2010). Esses autores também apresentaram uma cinética de Michaelis-Menten sem qualquer inibição, em concentrações que variaram de 0.008 – 15 mM de acetiltiocolina. Comparando-se a constante de Michaelis-Menten aparente ( $K_m^{app}$ ) e a concentração de acetiltiocolina obtidas na presente pesquisa com resultados apresentados na (Tabela 4, pag. 48) observa-se que a ChE do homogenato de cérebros de *C. macropomum* apresentou valor comparável aos valores de ( $K_m^{app}$ ) obtidos para *O. bonaerensis*, *Carassius auratus* e *Ostreae dulis* (MONSERRAT; BIACHINI, 2001;. LIU et al. 2007).

O valor do  $CI_{50}$  para o carbamato de eserina (controle positivo) tem sido utilizado como um índice de sensibilidade à inibição da ChE por pesticida (MONSERRAT; BIACHINI, 2001). Embora, a ChE dos cérebros de *C. macropomum* e *O. bonaeriensis* possuam afinidade comparável para acetilcolina, os seus valores de  $CI_{50}$  para o carbamato de eserina não são comparáveis (**Tabela 4**, pag. 48). O valor do  $CI_{50}$  para o carbamato de eserina foi de 0,158  $\mu\text{mol} / \text{L}$  (**Figura 9**, pag. 48) este valor foi comparável ao obtido por *Carassius auratus* de 0,117  $\mu\text{mol} / \text{L}$  (LIU et al. 2007). Contudo, comparando *C. macropomum* a uma espécie mais sensíveis ao carbamato de eserina, como *Odontesthes bonariensis* (TORTELLI et al. 2006; PIEDRAS; POUEY, 2005), espécie de alto valor comercial, assim como o *C. macropomum*, *O. bonariensis* da família Atherinidae naturalmente encontrado na América do Sul, mostra que tem maior sensibilidade para o carbamato de eserina ( $7,43 \times 10^{-5} \text{mmol} / \text{L}$ ).

Há poucos valores de  $CI_{50}$  relatados para herbicidas em peixes. Foi testado ChE no cérebro da enguia eléctrica exposta ao Diuron e Bentazon e mostraram valores de  $CI_{50}$  de 3,6  $\mu\text{M}$  e 0,135  $\mu\text{M}$ , respectivamente (AHMED et al. 2012). A ChE do robalo europeu juvenil apresentou um  $CI_{50}$  de 7,4 mg / L para Dichlorvos (VARO et al. 2003). A ChE de *Pseudokirchneriella subcapitata* mostrou valores de  $CI_{50}$  na faixa de 0,036 e 0,07 mg / L para a atrazina e molinato, respectivamente (PHYU et al. 2006). Os resultados do presente estudo demonstraram que a ChE de *C. macropomum* tem uma sensibilidade moderada à trifluralina com valor de  $CI_{50}$  (2,34  $\mu\text{mol} / \text{L}$ , correspondendo a 0,78 mg / L) em função da equação  $y = 3,441 X^2 + 7,804 X - 26,127$ ,  $R^2 = 0,99 \%$  (**Figura 10**, pag. 48). Também foi observada sensibilidade da atividade da ChE para Iso-OMPA que apresentou uma pequena inibição da enzima com o aumento da concentração (entre 14 e 33 % de inibição). Uma vez que o Iso-OMPA é considerado um inibidor específico para a butirilcolinesterase (SALLES et al. 2006, STURM et al. 2000), a diminuição observada na atividade da colinesterase do homogenato de cérebro incubado com concentrações de iso-OMPA indica a presença de butirilcolinesterase no cérebro de *C. macropomum*.

A Nativa PAGE do homogenato de células do cérebro de *C. macropomum* coradas com Coomassie não mostrou um perfil de bandas claramente separadas na **figura 11b1**, pag.50, mas a eletroforese não desnaturante em gel quando corada pelo método de Ellman, indicou a presença de duas bandas difusas com atividade ChE, na **figura 11b2**, pag.50. Uma vez que os resultados da inibição com iso-OMPA indicaram uma contribuição da butirilcolinesterase sobre a atividade da colinesterase do homogenato cerebral de *C.*

*macropomum*, os ensaios indicaram a presença das duas colinesterase AChE e a BChE no cérebro de (Tambaqui) *C.macropomum*.

#### 4.5. CONCLUSÃO

Em conclusão o presente trabalho demonstrou que as concentrações do herbicida trifluralina causam alterações neurotóxicas, dose-dependentes em cérebro e músculo de *C. macropomum* (Tambaqui). Esses resultados sugerem que a colinesterase – ChE do cérebro do *C. macropomum* pode ser considerada um biomarcador potencial da poluição aquática por herbicidas que contêm Trifluralina.

Para verificar a presença de AChE e BChE separadamente em homogenato de cérebro, a eletroforese nativa com zimograma parece ser a abordagem mais apropriada em estudos ecotoxicológicos com peixe, concomitantemente ao uso de seus inibidores específicos.

#### 4.6. REFERÊNCIAS

AHMED, M.; NADIA, L.; KHAN, R. A.; AHMED, A. Toxicological effect of herbicides (Diuron and Bentazon) on snake venom and electric eel acetylcholinesterase. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** 89:229–233, 2012.

Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) (1993) Nbr 12714: Água – Ensaio de toxicidade aguda com peixes – Parte I – Sistema Estático. Rio de Janeiro.

ALPUCHE-GUAL, L.; GOLD-BOUCHOT, G. Determination of esterase activity and characterization of cholinesterases in ther of fish *Haemulon plumiere*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 71:787-797, 2008.

ASSIS, C.R.D.; CASTRO, P.F.; AMARAL, I.P.G.; CARVALHO, E.V.M.M.; CARVALHO, JR.B.L.; BEZERRA, BR.S. Characterization of acetylcholinesterase from the brain of The amazonian Tambaqui (*Colossoma macropomum*) And in vitro effect of organophosphorus and carbamate pesticides. **Environ. Toxicol. Chem.** 29:2243–2248, 2010.

BRADFORD, M.M. The rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. **Annal. Biochem.** 72:248–254, 1976.

BRAND, R.M.; MUELLER, C. Transdermal penetration of atrazine, alachlor, and trifluralin: Effect of formulation. **Toxicol. Sciences**, 68:18–23, 2002.

BRETAUD, S.; TOUTANT, J.P.; SAGLIO, P. Effects of Carbofuran, Diuron, and Nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in Goldfish (*Carassius auratus*). **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 47:117-124, 2000.

CATTANEO, R.; MORAES, B.S.; LORO, V.L.; PRETTO, L.; MENEZES, C.; SARTORI, G.M.S.; CLASEN, B.; AVILA, L.A.; MARCHESAN, E.; ZANELLA, E. Tissue biochemical alterations of *Cyprinus carpio* exposed to commercial herbicide containing clomazone under rice-field conditions. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** 62:97–106, 2012.

CERÓN, H.J.J.; FERRANDO, M.D.; SANCHO, E.; GUTIERREZ-PANIZO, C.; ANDREU-MOLINER, E. Effects of diazinon exposure on cholinesterase activity in different tissues of European eel (*Anguilla anguilla*). **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 35: 222-225, 1996.

CHUIKO, G.M.; PODGORNAYA, V.A. Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase of freshwater teleosts. **Chem.-Biol. Interact.** 157:365-366, 2003.

COSTA, L.L.F.; SANT'ANA, E.S.; SUCHARA, E.S.; BENATO, V.S.; CARASEK, E. Determinação de herbicidas usados no cultivo de arroz irrigado na região sul do estado de santa catarina através da SPME-GC-ECD. **Química Nova**, 31:79-83, 2008.

CODEVASF. Aqüicultura: Codevasf se arma para a revolução azul. Plataforma para o futuro. Brasília. Brasília. Instituto FNP, pp. 48, 2006.

DELFINO, R.T.; RIBEIRO, T.S.; FIGUEROA-VILLAR, J.D. Organophosphorus compounds as chemical warfare agents: A review. **J. Braz. Chem. Soc.** 20:407-428, 2009.

ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES, JR. V. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochim. Pharmacol.* 7:88–95, 1961.

EPA – Reregistration Eligibility Decision (RED) Trifluralin. 738-R-95-040, April 1996.

GANGOLLI, S. The dictionary of substances and their effects. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 7, p. 998, 1999.

GOLOMBIESKI, J.I.; MARCHESAN, E.; CAMARGO, E.R.; JOSEÂNIA, S.; BAUMART, J. S.; LORO, S.L.; MACHADO, S.L.O.; ZANELLA, R.; BALDISSEROTTO, B. Acetylcholinesterase enzyme activity in Carp brain and muscle after acute exposure to diafuran. *Sci. Agric.* 65:340-345, 2008.

GLUSCZAK, L.; MIRON, D.S.; CRESTANI, M.; FONSECA, M.B.; PEDRON, F.A.; DUARTE, M.F.; VIEIRA, V.L.P. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 65:237–241, 2006.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA– IBGE / LSPA (2011) Levantamento Sistemático da Produção agrícola.  
[www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/.../lspa\\_201102.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/.../lspa_201102.pdf). access in :June 20, 2012.

KRAUT, D.; GOFF, H.; PAI, R.K.; HOSEA, N.A.; SILMAN, I.; SUSSMAN, J.L.; TAYLOR, P.; VOET, J.G. Inactivation studies of acetylcholinesterase with phenylmethylsulfonyl fluoride. *Mol. Pharmacol.* 57:1243-1248, 2000.

JONSSON, C.M.; MAIA, A.H.N.; FERREIRA, C.J.A.; RIBEIRO, E.O. (1998). Risk assessment of the herbicide clomazone in the aquatic life. *Verh. Internat. Verein. Limnol., Stuttgart.* 26, pp 1724–1726, 1998.

JOHNSON, W.W.; FINLEY, M.T. "Handbook of acute toxicity of chemicals to fish and aquatic invertebrates", Resource Publications 137. U.S. Department of the interior, fish and wildlife service, **Washington, DC**, pp 10-38, 1980.

LAEMMLI, U.K.. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680–685, 1970.

LEHNINGER, A. L. Lehninger princípios de bioquímica. 4 ed. São Paulo: SARVIER. 2006.

LIMA, I.O.; SANTOS, T.C.R.; JUNIOR, O.P.A. Spectrophotometric Procedure for Determination of Trifluralin in Soil. **Cad. Pesq.**, São Luís, v. 17, n. 1, 2010.

LIU, H. ; YI, M. ; SHI, X. ; LIANG, P. ; GAO, X. Substrate specificity of brain acetylcholinesterase and its sensitivity to carbamate insecticides in *Carassius auratus* **Fish Physiol. Biochem.** 33:29–34, 2007.

MARTINS, S.E.; BIANCHINI, A. Toxicity tests aiming to protect Brazilian aquatic systems: current status and implications for management. **J. Environ. Monit.** 13:18-66, 2011.

MAYER, F.L.; ELLERSIECK, M.R. "Manual of acute toxicity: Interpretation and data base for 410 chemicals and 66 species of freshwater animals". Resource Publication 160. U.S. Department of Interior, Fish and Wildlife Service, **Washington, DC**, 1986. pp.10-141, 1986.

MASSOULIE, J. ; PERRIER, N. ; NOUREDDINE, H. ; LIANG, D. ; BON, S. Old and new questions about cholinesterases. **Chem.-Biol. Interact.** 175:30–44, 2008.

MELO, A.M.S. Estudo eletroquímico da trifluralina, adsorção em quitosana, interação com o biossensor dsDNA e toxicidade frente ao caramujo *Biomphalaria glabrata*. **Tese de doutorado**, p.153, 2007.

MIRON, D.S.; CRESTANI, M.; SCHETINGER, M.R.; MORSCH, V.M.; BALDISSEROTTO, B.; TIerno, M.A.; MORAES, G.; VIEIRA, V.L.P. Effects of the herbicides clomazone, quinclorac, and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in

the silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae). **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 61:398–403, 2005.

MIRON, D.S.; PRETTO, A.; CRESTANI, M.; GLUSCZAK, L.; SCHETINGER, M.R.; LORO, V.L.; MORSCH, V.M. Biochemical effects of clomazone herbicide on piava (*Leporinus obtusidens*). **Chemosphere**, 74: 1-5. 2008.

MONSERRAT, J.M.; BIANCHINI, A. Anticholinesterase effect of eserine (Physostigmine) in fish and crustacean species. **J. Brazilian Arch. Biol. Technol.** 44, 1:63 – 68, 2001.

MORAES, B.S.; GLUSCZAK, L.; PRETTO, A.; MENEZES, C.; MARCHEZAN, E.; MACHADO, S.O.; LORO, V.L. Effects of four rice herbicides on some metabolic and toxicology parameters of teleost fish (*Leporinus obtusidens*). **Chemosphere** 68:1597–1601, 2007.

OAS/OSDE-Organization of American States Office for Sustainable Development and Environment (2005) São Francisco River Basin. *Integrated Management of Land Based Activities in the São Francisco River Basin*. Water Project Series, 4(October), 1-6, 2005.

PETRONILHO, E.C. ; PINTO, A.C. ; VILLAR, J.D.F. Acetilcolinesterase : Alzheimer e Querra Química. Revista Militar de Ciência e Tecnologia. Vol. XXVIII-3º Trimestre de 2011.

PERKINS, E. J. ; SCHELENK, D. In vivo metabolism, acetylcholinesterase inhibition, and toxicokinetics of aldicarb in channel catfish (*Ictalurus punctatus*), **Toxicology science**, 53, pag. 308. 2000.

PIEDRAS, S.R.N. ; POUEY, J.L.O.F. Alimentação do peixe-rei (*Odontesthes bonariensis*, Atherinopsidae) nas lagoas Mirim e Mangueira, Rio Grande do Sul, Brasil. **Sér. Zool.** 95:117-120, 2005.

PHYU, Y.L.; WARNEB, M.S.T.J.; LIMA, R.P. Toxicity and bioavailability of atrazine and molinate to the freshwater fish (*Melanotenia fluviatilis*) under laboratory and simulated field conditions. **Sci. Total Environ.** 356:86– 99, 2006.

RODRIGUES, N.R.; ALMEIDA, F.S. Guia de Herbicidas, fourth ed. Londrina, PR, Brazil, pp. 137–140, 1998.

YANG, Z.W.; TENDIAN, S.W.; CARSON, W.M.; BROUILLETTE, W.J.; DELUCAS, L.J.; BROUILLETTE, C.G. Dimethyl sulfoxide at 2.5% (v/v) alters the structural cooperativity and unfolding mechanism of dimeric bacterial NAD<sup>+</sup> synthetase. **Protein Sciences**, 13:830-841, 2004.

SALLES C.M.C., SALLES, J.B., CUNHA-BASTOS, V.L.F., SILVA, C.C. & CUNHA-BASTOS, J. Avaliação do efeito do metil paration sobre as enzimas do metabolismo da serotonina em cérebro de pacu por cromatografia líquida de alta eficiência. **Analyt.** 1(2):49-58. 2002.

SANCHO, E.; CERO, H.J.J.; FERRANDO, M.D. Cholinesterase Activity and Hematological Parameters as Biomarkers of Sublethal Molinate Exposure in *Anguilla anguilla*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 46:81-86, 2000.

SAGANE, Y.; TOOYUKI, N.; YAMAMOTO, K.; MICHIKAWA, S.; OGURI, S.; MOMONOKI, Y.S. Molecular characterization of maize acetylcholinesterase. A novel enzyme family in the plant kingdom. **J. Plant Physiol.** 138:1359-1371, 2005.

STURM, A.; WOGRAM, J.R.; SEGNER, H.; LIESS, M. Different sensitivity to organophosphates of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase from three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): application in biomonitoring. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Vol. 19, No. 6, pp. 1607–1615, 2000.

TJERNBERG, A.; MARKOVA, N.; WILLIAM, J.; GRIFFITHS, W.J.; HALLÉN, D. DMSO-Related effects in protein characterization. **J. Biomol. Screen.** 11:131, 2006.

TORTELLI, V.; COLARES, E.P.; ROBALDO, R.B.; NERY, L.E.M.; PINHO, G.L.L.; BIANCHINI, A.; MONSERRAT, J.M. Importance of cholinesterase kinetic parameters in environmental monitoring using estuarine fish. **Chemosphere** 65:560–566, 2006.

VARÓ, I.; NAVARRO, J.C.; AMAT, F.; GUILHERMINO, L. Effect of dichlorvos on cholinesterase activity of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 75:61–72, 2003.

WOYNAROVICH, E. Manual de piscicultura – Departamento de Produção e Desenvolvimento Rural, CODEVASF, Brasília, p. 69. 1993.

## 5 ARTIGO II - AVALIAÇÃO DO EFEITO MUTAGÊNICO E GENOTOXICO DO HERBICIDA TRIFLURALINA UTILIZANDO *Collossoma macropomum* (TAMBAQUI) DO ENSAIO DO COMETA, TESTE DO MICRONÚCLEO E APOPTOSE

### RESUMO

*Collossoma macropomum* (Amazônia Tambaqui) é uma espécie de peixe dominante e altamente adaptável, que é intensamente cultivado em culturas de arroz de peixe em uma variedade de plantações de água no delta do rio São Francisco no Nordeste do Brasil. As formulações comerciais de herbicidas que contêm Trifluralina ( $\alpha, \alpha, \alpha$  - trifluoro-2,6-dinitro-N, N-dipropil-p-toluidina) são comumente utilizados para controlar ervas daninhas de grãos nos campos de arroz da área. O *C. macropomum* é uma espécie importantes comerciais e trifluralin mostraram toxicidade em outras espécies de peixes, o principal objetivo deste estudo foi avaliar in vivo os efeitos de toxicidade aguda do herbicida trifluralin puro sobre Tambaqui pelo teste, cometas e apoptose ensaios de micronúcleos. Tambaqui foi exposto a diferentes concentrações (0,74; 1,5; 2,23; 3,0  $\mu\text{M}$  ou 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 mg / L) durante um período de 96 horas e a concentração mais baixa, com efeitos mutagênicos e genotóxica significativas, foi determinada. Todas as concentrações utilizadas, mostraram frequência de micronúcleos e nível de danos no DNA maior do que seus respectivos controles negativos. A concentração de 1,5  $\mu\text{M}$  (0,5 mg / L) mostrou uma frequência mais elevada com o aumento de micronúcleos danos no DNA e consecutivo aumento no número de células em apoptose.

**Palavras chaves:** Agroquímicos, peixes, Bioacumulação, Bioindicador, Meio ambiente.

Foi submetido ao Journal Ecotoxicology

## ABSTRACT

*Colossoma macropomum* (Amazonian Tambaqui) is a dominant and highly adaptable fish species that is intensively cultivated in rice fish cultures in a variety of water paddies in the delta of the São Francisco River in northeast Brazil. Commercial formulations of herbicides containing Trifluralin ( $\alpha, \alpha, \alpha$  – trifluoro-2,6-dinitro-N,N-dipropyl-p-toluidine) are commonly used to control weed of grain yield in the rice fields of the area. Since *C. macropomum* is a commercial important species and trifluralin has shown toxicity in other fish species, the main goal of this study was to evaluate *in vivo* the acute toxicity effects of herbicide pure trifluralin on Tambaqui by the micronuclei test, comet and apoptosis assays. Tambaqui was exposed to different concentrations (0.74, 1.5, 2.23, 3.0  $\mu\text{M}$  or 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 mg/L) for a period of 96 hours and the lowest concentration with significant mutagenic and genotoxic effects was determined. All the concentrations used, showed micronuclei frequency and DNA damage level higher than their respective negative controls. The concentration of 1.5  $\mu\text{M}$  (0,5mg/L) showed a higher micronuclei frequency with increased DNA damage and consecutive increase in the number of cells in apoptosis.

**Keywords:** Agrochemicals, fish, Bioacumulantion, bioindicator, Environmental.

## 5.1. INTRODUÇÃO

Vários estudos têm demonstrado a gravidade da contaminação das águas superficiais por agrotóxicos (MOSESSO, 2012). Ao longo das décadas o comércio e a utilização de pesticidas têm aumentado no Brasil. Devido à proximidade do ecossistema aquático com fazendas de produção agrícola no Brasil, a aplicação de pesticidas em áreas agrícolas coloca em risco a biota aquática principalmente em fazendas de piscicultura intensiva (MARTINS; BIANCHINI, 2011).

A produção de arroz irrigado é uma cultura importante no Brasil com alta produtividade e, conseqüente, aplicação de agrotóxicos, juntamente com as novas tecnologias, os agrotóxicos têm contribuído para aumentar a sua produção (RESGALLA JR, 2002). Herbicidas têm sido amplamente utilizados em plantações de arroz no Brasil (MORAES et al. 2007). No Nordeste, a produção de arroz se destaca na região do delta do rio São Francisco que compreende uma área de aproximadamente 30.000 km<sup>2</sup> (CODEVASF, 2006). Esta área é caracterizada pela alta produção de arroz irrigado que em 2010 foi de aproximadamente 11 milhões de toneladas (IBGE, 2011).

No cultivo de arroz irrigado no Delta do Rio São Francisco são empregados vários herbicidas, tais como: trifluralina, clamazone, quinclorac, penxosulam, 2,4-D, propanil, alaclor, paraquat, atrazina. Todos estes são utilizados para controlar ervas daninhas (COSTA et al. 2008; CATTANEO et al. 2012). Estudos de produção agrícola e animal realizados pela Companhia de Desenvolvimento dos Vales do Rio São Francisco e do Parnaíba tem indicado o consórcio entre a cultura de arroz e a produção de peixe nas águas rasas dos arrozais (CODEVASF, 2006).

No entanto, estudos visando a saúde animal indicaram que formulações comerciais de herbicidas contendo clomazone em campos de arroz podem causar alterações nos parâmetros de estresse oxidativo em *L. obtusidens* (Piava) (MIRON, 2008). Também em condições de campo, Cattaneo et al. (2010) submetem o *Cyprinus carpio* (Carpa) à contaminação com penxosulam, o qual apresentou ação neurotóxica e alterações nos parâmetros de estresse oxidativo. No ano seguinte Cattaneo et al. (2011) expôs o mesmo peixe *Cyprinus carpio* (Carpa) o glifosato, o qual indicou claramente alterações em nível de peroxidação lipídica e ação anti-colinesterásica. Outros herbicidas como quinclorac e metsulfuron também apresentaram ação anti-colinesterásica e indução de alterações bioquímicas em *Leporinus obtusidens* (PRETTO et al. 2011).

A Trifluralina ( $\alpha, \alpha, \alpha$ -trifluoro-2,6-dinitro-N, N-dipropil-p-toluidina) é um componente de herbicidas empregado por várias empresas no Brasil e no mundo (LIMA et al. 2010). Herbicida do grupo químico das dinitroanilinas, a trifluralina é utilizada para controlar muitas gramíneas anuais e ervas daninhas em culturas como: fruticultura, hortaliças e grãos, incluindo o arroz, soja, girassol, algodão, milho e o feijão. É um herbicida que atua interrompendo a divisão celular (LIMA et al. 2010). Embora, a trifluralina seja classificada pelo ministério da Saúde do Brasil como substância de moderada toxicidade para humanos, sua exposição crônica em ratos induziu a carcinomas (Ministerio da Saude, 1998; NCI, 2000). Em *Cyprinus carpio L* (Carpas) expostas a 0,02 mg / L de trifluralina durante 14 dias apresentaram aumento da atividade do aspartato aminotransferase no soro sanguíneo e necrose dos hepatócitos (POLEKSICK; KARAN, 1999).

Possíveis efeitos clastrogênicos tem sido mencionados em exposição a trifluralina, assim o teste do micronúcleos (MN) é considerado um método útil para avaliar o potencial clastogênico e aneugênico dos agentes ambientais (VICARI et al. 2012). Este ensaio tem sido usado em peixes para analisar *in vivo* os efeitos mutagênicos de produtos químicos presentes no ambiente aquático. Micronúcleos são massas intracitoplasmáticas de fragmentos do cromossomo, ou cromossomos inteiros, que retardam a divisão celular, devido à falta de um centrômero, danos no DNA, ou um defeito na citocinese (VICARI et al. 2012). Em *Oreochromis niloticus* (Tilápias) expostas a 1, 5 e 10  $\mu\text{g} / \text{L}$  de trifluralina ocorreu um aumento da frequência de micronúcleos em eritrócitos periféricos (KÖNEN; CAVAS, 2008).

O Teste do cometa é outra ferramenta importante para genotoxicidade e monitoramento em ambientes aquáticos. No Teste do cometa, ou eletroforese em gel de célula única, permite detectar danos no DNA induzidos por alquilação, intercalado a agentes oxidantes (MATSUMOTO et al. 2006). O ensaio do cometa tem a vantagem de aplicação a qualquer tecido de interesse e detecta várias classes de danos no DNA. O ensaio do cometa mostrou uma excelente aplicação para monitoramento de genotoxicidade aquática em *Cyprinus carpio* (Carpa), *Oncorhynchus mykiss* (truta arco-íris), e *Spisula sachalinensis* (mariscos) (KIM; HYUN, 2006). O ensaio do cometa também tem sido utilizado para distinguir células apoptóticas e não apoptóticas (SINGH, 2000) com base no fato do elevado nível de danos no DNA que conduz a apoptose celular. O ensaio do cometa em eritrócitos de *Oreochromis niloticus* (Tilápia do Nilo) e *Clarias gariepinus* (bagre africano) demonstraram efeito genotóxico em estudos de monitoramento *in situ* (OSMAN et al. 2012).

O *C. macropomum* (Tambaqui) é um peixe characidae nativo da bacia amazônica e habitante dos rios do Brasil, Venezuela, Colômbia, Peru e Bolívia (TAPHORN, 1992 apud CUNHA; SANTOS, 2011). Com ampla distribuição geográfica são comumente encontrados em matas inundadas, lagos de várzea e rios de águas barrentas (FERREIRA, 2006). Esta espécie tem fornecido dados relevantes para a avaliação da poluição ambiental nos rios (ASSIS et al. 2010; ROCHA et al. 2011). *C. macropomum* é uma espécie altamente comercializada em toda a região Nordeste, e este estudo também é importante para monitorar sua exposição a riscos ambientais.

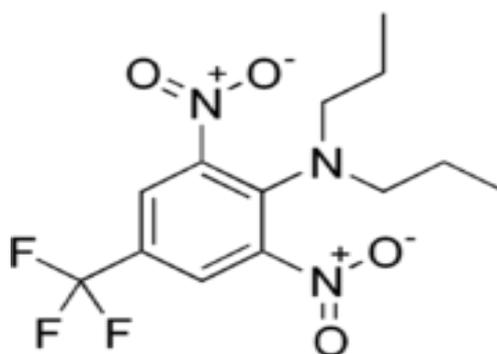
A fim de avaliar o efeito genotóxico e mutagênico e da trifluralina em eritrócitos de *C. macropomum* (Tambaqui), utilizando o Ensaio do Cometa e teste do micronúcleo, a presente pesquisa foi realizada objetivando-se indicar essa espécie como sentinela para a região do delta do rio São Francisco.

## 5.2. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.2.1. Reagentes

Os seguintes produtos químicos foram obtidos a partir da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO): Giemsa; metanol; Agarose Low melting point; Brometo de etídio; Dimetilsulfóxido; Etil-diaminotetracetato de sódio (Na<sub>2</sub>EDTA); Triton X-100; N-Lauril-sarcosinato; Ácido clorídrico; Hidróxido de sódio; Cloreto de sódio, Niclosamida e uma formulação comercial do herbicida trifluralina ( $\alpha,\alpha,\alpha$  trifluoro – 2,6-dinitro-N,N – dipropyl-p-toluidine) (CAS number 1582-09-8) que foi purificado até 98% de pureza por Melo (2007) no laboratório de eletroquímica da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), antes de ser utilizado neste experimento (**Figura 1**, pag. 65).

**Figura 1** – Estrutura química da Trifluralina



Fonte: <http://en.wikipedia.org/wiki/Trifluralin>

### 5.2.2. Animais

O *C. macropomum* (Tambaqui) é um peixe presente no baixo do rio São Francisco. É uma espécie de valor econômico significativo para a piscicultura intensiva. Animais com ampla distribuição geográfica são comumente encontrados em matas inundadas, lagos de várzea e rios de águas barrentas animais (CODEVASF, 2006). Foram utilizados animais com peso médio de  $42,51 \pm 8,20$  g, e com  $14,36 \pm 1,04$  cm de comprimento total fornecidos Companhia Hidro Elétrica do São Francisco (CHESF) (**Figura 2**, pag.66)

**Figura 2** - Tambaqui (*Colossoma macropomum*)



Fonte: Autor desta tese, 2011

### 5.2.3. Preparação do Experimental

Os 500 peixes foram aclimatados às condições de laboratório durante 5 dias, em quatro tanques (250 L), contendo a água livre de herbicidas antes das experiências. Eles foram mantidos em água continuamente oxigenada em sistema estático e com fotoperíodo natural (12 h luz \ escuro 12 h). No período de aclimação, os peixes foram alimentados uma vez por dia com ração comercial para peixe, contendo 38 % de proteína bruta. Este modelo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alagoas (Processo N ° 024854 / 2010-11).

#### 5.2.4. Teste de Toxicidade *in vivo*

Após aclimatação, os animais foram transferidos para 28 aquários 70 L sob oxigenação individual e as variáveis de qualidade da água monitorada. Grupos de 8 animais por aquário foram expostos a quatro diferentes concentrações de trifluralina (0,74; 1,5; 2,23; 3,0  $\mu\text{mol} / \text{L}$ ) durante um período de 96 h. Nos tratamentos T1, T2, T3 e T4 foram utilizadas as concentrações de trifluralina com quatro repetições cada. O valor da  $\text{CL}_{50}$  da trifluralina foi determinado com base na média do percentual de mortalidade dos dois experimentos realizados. Soluções de trifluralina foram administradas; na água em condição estática, com quatro repetições cada. O número total de peixe usado neste experimento foi de 224 exemplares. Devido à solubilidade muito baixa da trifluralina, cada solução foi preparada em 1 % de dimetilsulfóxido (DMSO) com uma concentração final no aquário de 0,14 % DMSO. No experimento, foram estabelecidos três controles com o mesmo número de repetição que foram utilizados nos tratamentos: controle negativo, controle solvente (DMSO) e controle positivo com niclosamida 3  $\mu\text{g}/\text{L}$ . A niclosamida tem sido utilizada como teste positivo em ensaios com peixes (MONKIEDJE et al. 1991), além de ser utilizada como moluscicida desde 1960 (RIBEIRO et al. 2009). A niclosamida prejudica as vias respiratória e estômago dos animais (CAS 738 F99-013, 1999).

#### 5.2.5. Variáveis de qualidade de água

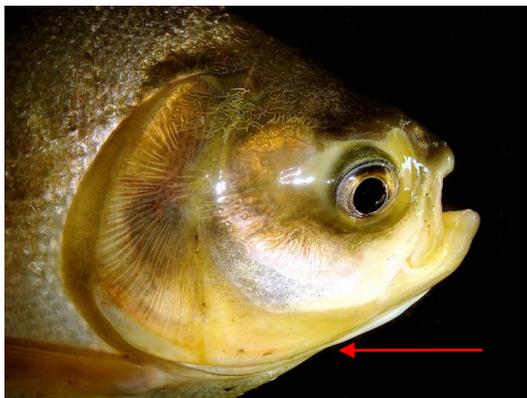
A água dos aquários foram monitoradas quanto ao pH, temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) e oxigênio dissolvido ( $\text{mg} / \text{L}$ ), com medições e registros a cada 24 horas (ABNT, 1993). Os animais expostos e os controles, não foram alimentados durante o tempo de exposição. Após o tempo de exposição, os animais foram capturados e colocados num banho de gelo para ficarem anestesiado.

#### 5.2.6. Coleta e diluição de amostra de sangue

O sangue foi recolhido a partir de uma incisão abaixo do opérculo do peixe (**Figura 3**, pag.68) que foi retirado uma gota de sangue. 50 $\mu\text{L}$  desse sangue foram coletados em eppendof e adicionados ao tampão fosfato salino PBS 1x (0,09M), contendo EDTA (20 mM) em uma proporção de 5:1 para evitar a coagulação, adaptado do MANIATIS (1989). Em

seguida, uma gota foi retirada para o teste de micronúcleo. Para o ensaio do cometa, a amostra foi diluída 8 vezes em PBS contendo EDTA (20 mM). Esta diluição foi definida previamente como sendo a melhor sequência de diluição para ensaio do cometa.

**Figura 3-** Localização opercular do *C. macropomum* (Tambaqui)



Fonte: <http://olhares.uol.com.br/o-tambaqui-que-eu-pesquei-foto1990665.html>

#### 5.2.7. Ensaio do Cometa

A versão alcalina do ensaio cometa foi realizado de acordo com as diretrizes propostas por Singh et al. (1988) e Tice et al. (2000), com algumas adaptações. As lâminas foram pré-revestidas com 1,0 % de agarose padrão (SIGMA-ALDRICH ®) em PBS. As amostras de sangue diluído foram homogeneizadas com 0,5% de agarose em baixo ponto de fusão (LMP - SIGMA-ALDRICH ®) em PBS (1:10). 40µL foram colocados em duplicata. As lâminas foram cobertas com lamínulas e refrigeradas durante 5 min em gelo em gel. Os outros 40µL de agarose LMP foram adicionados e repetidas as mesmas condições. Isto foi seguido por imersão em solução gelada de lise alcalina (2,5 M NaCl, 10 mM, 100 mM Tris etilenodiaminotetra-acético (EDTA), 10% de dimetilsulfóxido, 1% Triton X-100, pH final 10,0) durante 1 hora. As lâminas foram então incubadas durante 20 min em solução de corrida para electroforese (0,3 M de NaOH, 1 mM EDTA, pH 13), seguido por electroforese a 25 V: 300 mA (1,25 V/cm) durante 20 min. Após a electroforese, as lâminas foram então neutralizadas (0,4 M de Tris, pH 7,5) e coradas com SYBER Green (Invitrogen™) diluído em PBS (1:200) durante 10 min. Cem células por amostra foram contadas para obter o percentual de escores em microscópio de epifluorescência (Olympus - PM 20) usando 400x. A quantificação de quebra de DNA foi realizada por avaliação visual e as células foram classificadas em quatro categorias representando diferentes graus de danos no DNA, desde a

ausência de migração visível (classe 0, células intactas), para o comprimento máximo do cometa [classe 3, células maximamente danificados (DC)] (KOBAYASHI et al. 1995).

A taxa de células danificadas foi obtida somando-se o número de células não danificadas (classe 0) mais o número de células danificadas a partir de cada classes 1, 2 e 3, e dividindo-se pelo número total de células analisadas em cada tratamento. A percentagem de escore total ou unidade arbitrária para 100 nucleóides foi obtida pela multiplicação do número de células em cada classe por classe de dano, de acordo com a fórmula modificada por (MANOHARAN; BANERJEE, 1985). A percentagem de escore total foi obtida por:  $(0 \times n_0) + (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3)$ , onde n = número de células em cada classe analisada. Assim, a percentagem de escores total ou unidade arbitrária pode variar de 0 - 100 células ausentes de danos até 300, tendo todas as células com danos classe 3.

#### 5.2.8. Teste do Micronúcleo

O sangue foi coletado a partir da incisão abaixo do opérculo do peixe diluído e gotejado sobre a lâminas, fazendo-se o esfregaço e secando ao ar durante 30 minutos. Posteriormente, foram fixadas em metanol durante 10 min e coradas com solução de Giemsa 5% durante 30 min. Todas a lâminas foram codificadas. Duas lâminas para cada peixe e quatro para cada repetição do tratamento. Foram examinados 1.800 eritrócitos em cada tratamento. Para detectar micronúcleos nos eritrócitos, as lâminas foram analisadas utilizando um microscópio Labomed Lx400 com óleo de imersão, para melhor visualização. Foram identificados por corpos ovóides de cromatina circular da mesma coloração que o núcleo da célula. A frequência de MN foi calculada como:  $\% \text{ MN} = \frac{\text{Número de células com micronúcleos}}{\text{número total de células contadas}}$  (AL-SABTI; METCALFE, 1995).

#### 5.2.9. Apoptose

O ensaio de apoptose (ou teste de difusão em gel) foi realizado de acordo com Singh (2000) e alguns procedimentos foram realizados em adaptação. Seguiu-se exatamente a metodologia do ensaio do cometa até a solução de lise. As lâminas foram então imersas durante 10 min em uma solução de corrida resfriada. Em seguida, as amostras foram imersas em uma solução de acetato de amônio em etanol a 90 % durante 15 min e, finalmente, em etanol a 75 % durante 15 minutos. As lâminas foram deixadas para secar à temperatura

ambiente e coradas com syber Green (Invitrogene TM) diluída em PBS (1 : 200) durante 10 min. Cem células por amostra foram utilizadas e os escores visualizados usando microscópio de epifluorescência 400x (Olympus - PM 20). A classificação foi feita de acordo com a presença ou ausência de halos em torno de cada nucleóide (SINGH, 2000).

#### 5.2.10. Análises Estatísticas

Os dados de ensaios de cometa, micronúcleo e apoptose foram analisados utilizando GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc.) usando o teste de análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de média Student-Newman-Keuls (SNK), com um intervalo de confiança de 95 % ( $p < 0,05$ ), ( $p < 0,01$ ); ( $p < 0,001$ ).

### 5.3. RESULTADOS

#### 5.3.1. Ensaio do cometa

Os resultados em termos de níveis de danos individuais no DNA são apresentados na **Tabela 1**. Após 96 h de exposição, foi possível identificar nos eritrócitos de todos os peixes expostos ao herbicida trifluralina, dano nível 1 com pequena variação entre os tratamentos. Os eritrócitos dos peixes expostos a 1,5 e 3,0  $\mu\text{M}$  do herbicida trifluralina apresentaram aumento nos valores de dano nível 2, quando comparado com o controle negativo, enquanto que nas outras concentrações de 0,74 e 2,23  $\mu\text{M}$  não foram observados dano nível 2.

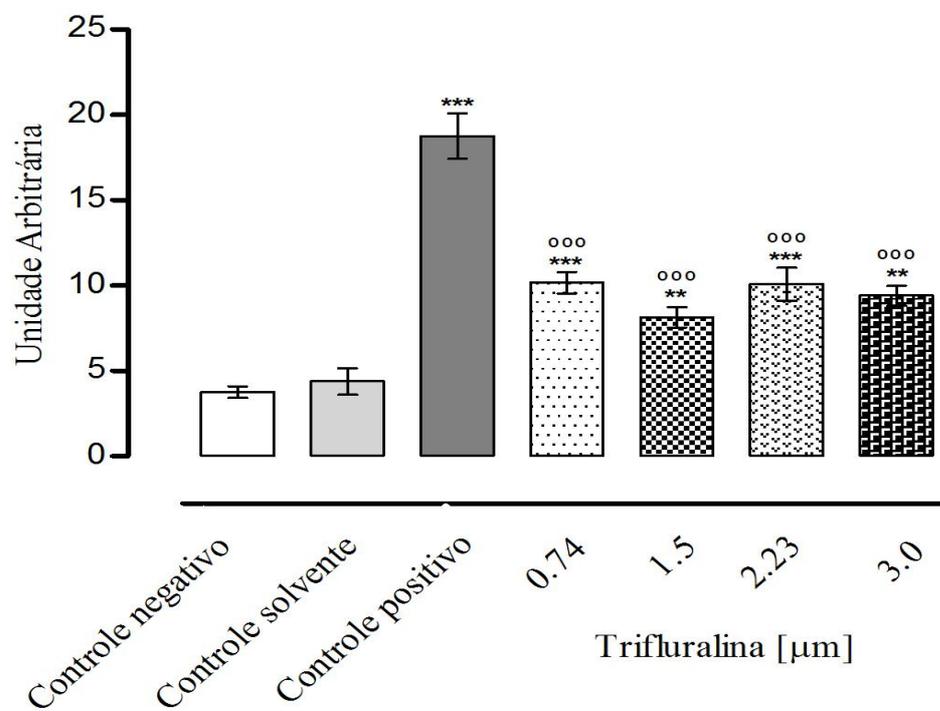
Todas as concentrações analisadas de trifluralina induziram a aumento significativo nos valores da unidade arbitrária e na frequência de células danificadas comparado aos controles negativo e solvente ( $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ ). Para ambos os parâmetros analisados unidade arbitrária (U. A.) e/ou células danificadas (CD) apresentaram um grau de dano no DNA em função da concentração analisada que foi de (0,74 = 2,23 > 1,5 = 3,0  $\mu\text{M}$ ) comparável ao controle positivo (**Tabela 1**, pag.71). Destacando-se uma influência da menor concentração do herbicida trifluralina sobre a magnitude dos danos. Em geral pode ser considerado que entre as diferentes concentrações do herbicida trifluralina o dano nível 1 foi o que mais prevaleceu após o tempo de exposição. Porém, o dano causado se manteve nas concentrações de 1,5 e 3,0  $\mu\text{M}$  até o nível 2 .

**Tabela 1** - Frequência média de cada classe de dano no DNA ( $\pm$  desvio padrão) determinado pelo ensaio do cometa em eritrócito periférico de *C. macropomum* exposto por 96h em diferentes concentrações do herbicida trifluralina

<i>Tratamentos</i>	<i>Nível 0</i>	<i>Nível 1</i>	<i>Nível 2</i>	<i>U.A.</i>	<i>CD</i>	
	<i>Média <math>\pm</math> DS</i>	<i>Média <math>\pm</math> DS</i>	<i>Média<math>\pm</math>DS</i>	<i>Média <math>\pm</math> DS</i>	<i>Média<math>\pm</math>DS</i>	
<i>Controle Negativo</i>	96,25 $\pm$ 0,60	3,75 $\pm$ 0,60	0,00 $\pm$ 0,00	3,75 $\pm$ 0,60	0,04 $\pm$ 0,01	
<i>Controle Solvente</i>	95,63 $\pm$ 1,35	4,38 $\pm$ 1,35	0,00 $\pm$ 0,00	4,38 $\pm$ 1,35	0,04 $\pm$ 0,01	
<i>Controle Positivo</i>	82,67 $\pm$ 1,54	15,92 $\pm$ 1,56	1,42 $\pm$ 0,38	18,75 $\pm$ 2,32	*** 0,17 $\pm$ 0,02	***
<i>0,74 <math>\mu</math>M</i>	89,82 $\pm$ 1,09	10,18 $\pm$ 1,09	0,00 $\pm$ 0,00	10,18 $\pm$ 1,09	*** 0,10 $\pm$ 0,01	***
<i>1,50 <math>\mu</math>M</i>	91,93 $\pm$ 0,94	8,00 $\pm$ 0,91	0,07 $\pm$ 0,07	8,14 $\pm$ 1,05	** 0,08 $\pm$ 0,01	**
<i>2,23 <math>\mu</math>M</i>	89,93 $\pm$ 1,72	10,07 $\pm$ 1,72	0,00 $\pm$ 0,00	10,07 $\pm$ 1,72	*** 0,10 $\pm$ 0,02	***
<i>3,00 <math>\mu</math>M</i>	90,65 $\pm$ 0,92	9,30 $\pm$ 0,92	0,05 $\pm$ 0,05	9,40 $\pm$ 1,02	** 0,09 $\pm$ 0,01	**

Nota: Os peixes foram mantidos em controle negativo (água), controle solvente (dimetilsulfóxido – DMSO), controle positivo (niclosamida - 3.0  $\mu$ g/L) e diferentes concentrações de trifluralina (0,74; 1,5; 2,23; 3,0  $\mu$ mols/L). DS: Desvio padrão; UA: Unidades arbitrárias, CD: Células danificadas. A análise estatística utilizada foi ANOVA com pós-teste de Newman-Keuls (P <0,05). \*\* P <0,01; \*\*\* P <0,001 em comparação com o controle negativo.

Na **Figura 4**, pag 72 são apresentados um gráfico com os resultados dos experimentos do ensaio do cometa com *C. macropomum* (Tabaqui) exposto a diferentes concentrações do herbicida trifluralina *in vivo* comparado com o controle positivo.



**Figura 4** - Dano ao DNA de cadeia simples de eritrócitos do sangue periférico de Tabaqui (*C.macropomum*). A unidade arbitrária foi calculada usando a fórmula de Manoharan e Banerjee. A análise estatística utilizada foi ANOVA com pós-teste de Newman-Keuls. \*\* P <0,01, \*\*\* P <0,001 em comparação com água. P ° ° ° <0,001 comparado com o controle positivo.

### 5.3.2. Teste do micronúcleo

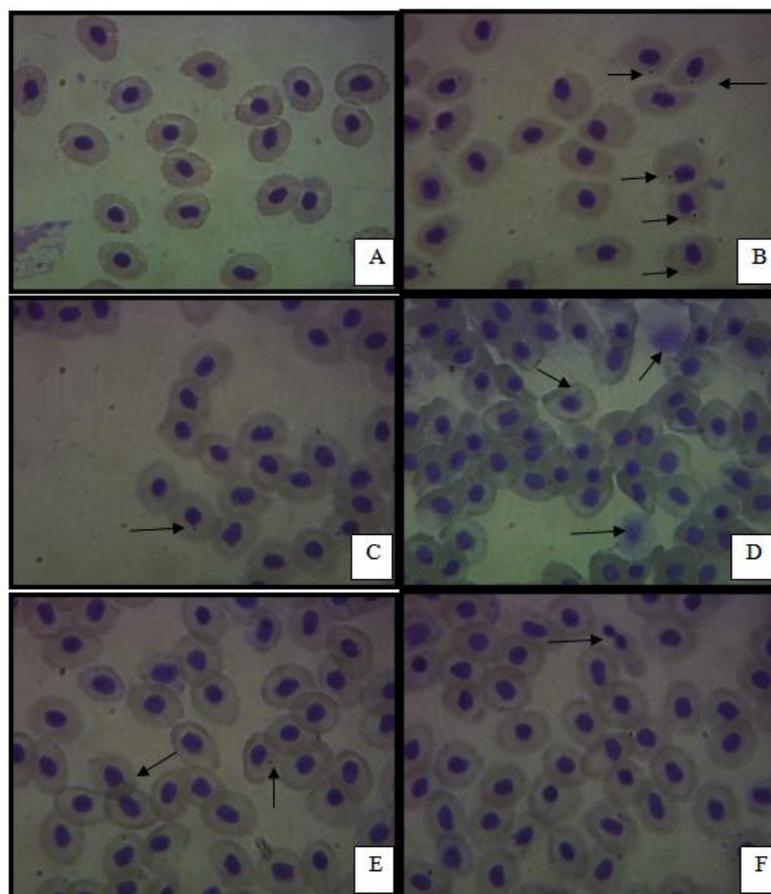
A **Tabela 2** apresenta a frequência de micronúcleos obtidos na presença das diferentes concentrações do herbicida trifluralina. A primeira concentração analisada de 0,74 µm não apresentou indução significativa de micronúcleos comparada com o controle negativo. Enquanto que as outras concentrações induziram significativamente o aumento na frequência de micronúcleos (p<0,05). A concentração de 1,5 µm apresentou a maior indução de micronúcleos, seguida da concentração de 3,0 µm, ambas induziram formação de micronúcleos semelhante ao controle positivo. Deste modo, não foram encontrados efeito dose-dependente desse herbicida em eritrócitos de tabaqui (*C.macropomum*). Essa resposta pode ter acontecido, devido à alta toxicidade do herbicida uma vez que o teste do micronúcleo quantifica danos irreversíveis ao DNA (**Figura 5**, pag. 73).

**Tabela 2** – Frequência de micronúcleo em eritrócitos periférico de tambaqui (*Colossoma macropomum*) exposto a trifluralina por 96 horas

Tratamentos	Frequência de MN em (96 horas)
Controle Negativo	0,1250±0,1314 <sup>a</sup>
Controle Solvente	0,1350±0,064 <sup>a</sup>
Controle Positivo	1,5321±0,1681 <sup>c</sup>
0,74 µM	0,1523±0,052 <sup>a</sup>
1,5 µM	1,1318±0,1604 <sup>c</sup>
2,23 µM	0,4995±0,1691 <sup>b</sup>
3,0 µM	0,7962±0,1740 <sup>bc</sup>

Fonte: Equação  $((N_{MN} / N_N) * 100\%)$

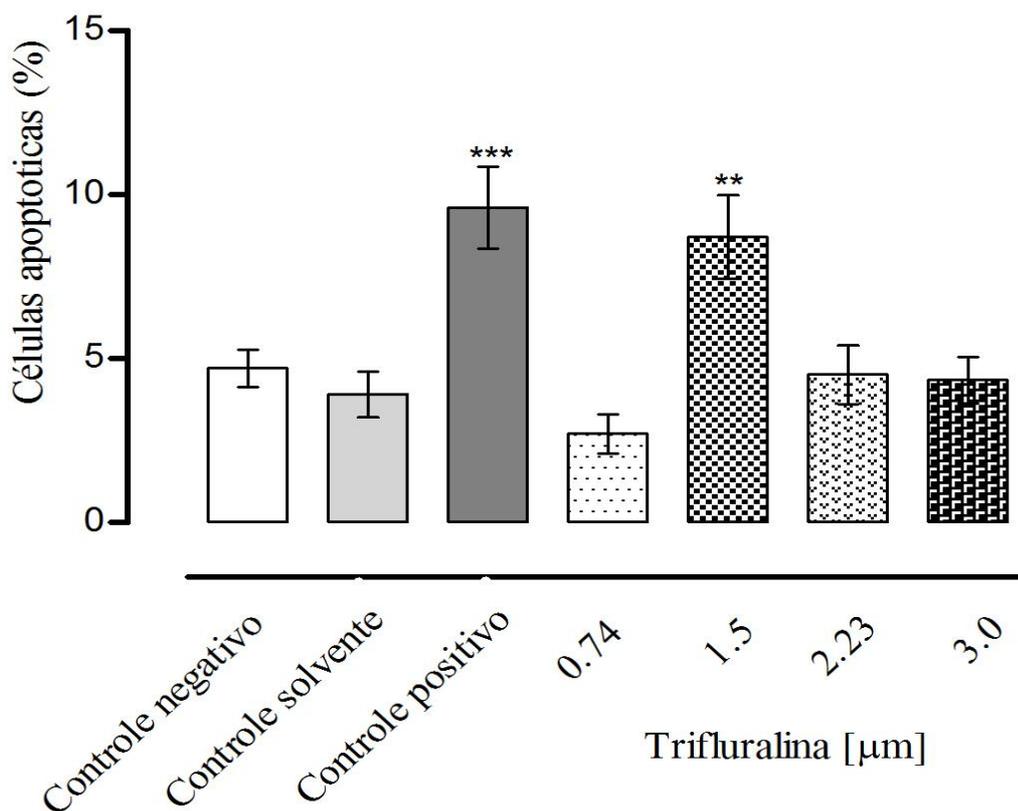
The statistical analysis used was one-way ANOVA with post test Newman-Keuls ( $P < 0,05$ )



**Figura 5** – Micronúcleus e anormalidades nucleares encontrados em eritrócitos peritoneal de *C. macropomum* exposto ao herbicida trifluralina. (A) Células sem micronúcleus; (B) células com micronúcleus; (C) células com núcleos lobados; (D) células com micronúcleus e células em apoptose; (E) células com micronúcleus e células com anormalidades nucleares; (F) células binucleadas.

### 5.3.3. Numero de células em apoptose

A distribuição da frequência dos núcleos em apoptose detectados por ensaio de difusão é apresentado na **Figura 6**, pag. 74. Durante o experimento os controles negativo e solvente, apresentaram níveis normais de células em apoptose, sem efeito significativo. A distribuição da frequência de células apoptóticas foi mais elevada nos eritrócitos de peixes expostos a concentração de 1,5  $\mu\text{moles/L}$  da trifluralina. Com o aumento da concentração para (2,23 e 3,0  $\mu\text{moles/L}$ ) essa frequência de células em apoptose foi menor, não apresentando diferença significativa entre os controles negativo e solvente. Isto pode ter ocorrido devido à atividade tóxica da substância, a qual inibe a divisão celular e, evitando a visualização do efeito apoptótico dependente da condensação e fragmentação do DNA.



**Figura 6** - Efeito apoptótico da trifluralina em diferentes concentrações. Os dados foram analisados por um teste ANOVA com pós-teste de Newman-Keuls. \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$  em comparação com o controle positivo.

## 5.4. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou com o teste do micronúcleo e o ensaio do cometa o efeito mutagênico e genotóxico do herbicida trifluralina em *C. macropomum* (Tambaqui). Os resultados dos ensaios do cometa mostram o efeito da toxicidade aguda do herbicida trifluralina nos eritrócitos da espécie estudada. Embora, o dano causado ao DNA medido pelo ensaio do cometa foi observado em todas as concentrações do herbicida trifluralina, não foi observado um aumento nos valores de acordo com um padrão dose-resposta. A extensão dos danos no DNA expresso como unidade arbitrária se manteve similar em todas as concentrações. Esta resposta pode ter ocorrido devido ao mecanismo de reparo celular, que é uma indicação de que o *C. macropomum* pode adaptar-se às concentrações de trifluralina utilizadas no ensaio de toxicidade aguda em 96 h. Esta hipótese se reforça pelo fato de não ter sido observado dose letal após o tempo de exposição.

Concomitantemente ao ensaio do cometa, o teste do micronúcleo também não mostrou um padrão dose-resposta com o aumento da concentração de trifluralina, todas as concentrações a partir de 1,5  $\mu\text{M}$  apresentaram frequência de micronúcleos maior do que o controle negativo. O mesmo padrão de indução de micronúcleo não foi observado com o aumento da concentração em 96 h de exposição, devido à elevada toxicidade do herbicida, uma vez que o teste do micronúcleo quantifica danos irreversíveis ao DNA. Nas concentrações de 2,23 e 3,0  $\mu\text{M}$  os eritrócitos de *C. macropomum* podem ter iniciado o processo de degeneração celular, reduzindo o número de células com micronúcleo. Konen; Cavas (2008) analisaram o efeito das concentrações de trifluralina (1, 5 e 10  $\mu\text{g} / \text{L}$ ) em *Oreochromis niloticus* (Tilápia do Nilo) expostas por 72, 144 e 216 h e observaram aumento significativo na frequência de micronúcleo nos animais expostos, indicando o potencial mutagênico desse herbicida trifluralina em peixes. Desde 1996, a Agência de Proteção Ambiental - EPA indica que o herbicida trifluralina contendo n-nitrosodi-n-propylamina é de moderada a altamente tóxico para os peixes de água doce e invertebrados, e altamente tóxico para os peixes e invertebrados estuarinos em estudos de toxicidade aguda. Fernandes et al. (2007) também estudaram a trifluralina, porém com outro sistema teste filogeneticamente distante dos organismos aquáticos. Esses autores encontraram uma notável ação aneugênica do herbicida trifluralina com a presença significativa de C-metáfase em suas análises. Embora a ação clastogênica da trifluralina não tenha sido reconhecida, as formulações comerciais

podem conter dipropylnitrosamina que é um componente cancerígeno que interage com o DNA (COOPER; STORTER, 2000).

Segundo Gebel et al. (1997) a trifluralina e a pendimethalina, que apresentam o mesmo mecanismo de ação, a atividade antimicrotúbulo, estudaram o efeito mutagênico de ambos em medula óssea de camundongos. A Pendimethalina não teve efeito mutagênico observado pelo teste do micronúcleo em células de medula óssea de camundongos macho ou fêmea. A aplicação da trifluralina resultou em aumento significativo na frequência de micronúcleo dos animais fêmea em comparação com animais não tratados. O herbicida trifluralina demonstrou ação aneugênicos / clastogênica significativa no teste do micronúcleo em animais fêmeas *in vivo*. Dimitrov et al. (2006) também estudaram células da medula óssea de camundongos para avaliar os efeitos causados por pendimethalina e observaram um aumento na frequência de células micronucleadas e aberrações cromossômicas. Após o tempo de exposição ao herbicida os autores sugeriram que os animais sofreram indução de aberrações cromossômicas devido à biossíntese de metabolitos genotóxicos. Estudos anteriores demonstraram que a indução máxima de micronúcleos ocorre normalmente 1-5 dias após a contaminação, mas na maioria das espécies de peixes ocorre entre 1 e 3 dias (SALVADORI; MARQUES; RIBEIRO, 2003; AL-SABTIE; METCALFE, 1995). Os resultados destes estudos enfatizaram a importância do teste do MN como uma ferramenta de biomarcador de exposição e efeito em peixes para poluentes em ambiente aquático.

Grisolia; Cordeiro (2000) e Cavalcante et al. (2008) indicaram a ciclofosfamida e a niclosamida como controle positivo a ser utilizado em teste do micronúcleo. Esses autores demonstraram que ambas as substâncias podem ser usadas como controle positivo da maior parte dos estudos com organismos aquáticos. No presente estudo, a niclosamida também foi utilizada como controle positivo demonstrando aumento significativo na frequência de micronúcleo observado em 96 h de exposição.

Em análise conjunta comparando os resultados do ensaio de cometa, teste micronúcleo e apoptose nas concentrações estudadas, foi possível observar uma correspondência entre os dados de detecção das anomalias cromossômicas nos eritrócitos de *C. macropomum*. No ensaio do cometa ainda é possível observar o efeito do mecanismo de reparo celular, agindo principalmente na concentração 0,74  $\mu$ M. Portanto, o número de células em apoptose confirmou os resultados do teste do micronúcleo, pois ao mesmo tempo em que o organismo induziu quebra na fita dupla do DNA com a formação de micronúcleos, também ocorreu morte programada das células por apoptose, com efeito significativo na concentração de 1,5

$\mu\text{M}$  do herbicida trifluralina comparado com o controle negativo em 96 h de exposição. Segundo Singh (2000) essa metodologia torna possível a detecção de todos os nucleóides em apoptose precoce e tardia. Contudo, o efeito observado nas demais concentrações de 2,23 e 3,0  $\mu\text{M}$  não se pode alegar que ocorreu morte celular por necrose ou apoptose, ou mesmo alta toxicidade com degeneração celular. Desta forma sugerimos a necessidade de estudos de citotoxicidade paralelo ao teste do cometa e número de células em apoptose em estudos de toxicidade aguda com o herbicida trifluralina.

## 5.5. CONCLUSÃO

O presente estudo apresentou a toxicidade aguda do herbicida trifluralina com efeito mutagênico e genotóxico para juvenis de *C. macropomum*. Com efeito significativo na concentração de 1,5  $\mu\text{M}$  por 96 horas.

## 5.6. REFERÊNCIAS

Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) (1993) Nbr 12714: Água – Ensaio de toxicidade aguda com peixes – Parte I – Sistema Estático. Rio de Janeiro

ASSIS, C.R.D.; CASTRO, P.F.; AMARAL, I.P.G.; CARVALHO, E.V.M.M.; CARVALHO, JR.B.L.; BEZERRA, BR.S. Characterization of acetylcholinesterase from the brain of The amazonian Tambaqui (*Colossoma macropomum*) And in vitro effect of organophosphorus and carbamate pesticides. **Environ. Toxicol. Chem.** 29:2243–2248, 2010.

AL-SABTI, K., METCALFE, C.D., Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutat. Research.** 323, 121–135.1995.

CAVALCANTE, D.G.S.M., MARTINEZ, C.B.R., SOFIA, S.H. Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.** 655, 41–46.2008.

CATTANEO, R.; MORAES, B.S.; LORO, V.L.; PRETTO, L.; MENEZES, C.; SARTORI, G.M.S.; CLASEN, B.; AVILA, L.A.; MARCHESAN, E.; ZANELLA, E. Tissue biochemical

alterations of *Cyprinus carpio* exposed to commercial herbicide containing clomazone under rice-field conditions. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** 62:97–106, 2012.

COSTA, L.L.F.; SANT'ANA, E.S.; SUCHARA, E.S.; BENATO, V.S.; CARASEK, E. Determinação de herbicidas usados no cultivo de arroz irrigado na região sul do estado de santa catarina através da SPME-GC-ECD. **Química Nova**, 31:79-83, 2008.

CODEVASF. Aqüicultura: Codevasf se arma para a revolução azul. Plataforma para o futuro. Brasília. Brasília. Instituto FNP, pp. 48, 2006.

COOPER, R.L.; STORKER, T.E. TYREY, L.; GOLDMAN, J.M.; MCELROY, W.K. Atrazine disrupts the hypothalamic control of pituitary-ovarian function, **Toxicological Sciences**, 53, p.297-307, 2000.

DIMITROV, B.D.; GADEVA, P. G.; BENOVA, D.K.; BINEVA, M.V. Comparative genotoxicity of the herbicides Roundup, Stomp, and Reglone in plant and mammalian test systems. **Mutagenesis**, 21, n.6, p. 357-382, 2006.

EPA – Reregistration Eligibility Decision (RED) Trifluralin. 738-R-95-040, April 1996.

EPA – Reregistration Eligibility Decision (CAS) Niclosamida. 738 F99 - 013, November, 1999.

FERNANDES, T.C.C., MAZZEO, D.E.C., MARIN-MORALES, M.A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 88, 252–259. 2007.

GEBEL, T.; KEVEKORDES, S.; PAV, K.; EDENHARDER, R.; DUNKELBERG, H. In vivo genotoxicity of selected herbicides in the mouse bone-marrow micronucleus test. **Arch Toxicol.** 71: 193 – 197. 1997.

GRISOLIA, C.K., CORDEIRO, C.M.T. Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. **Genetics and Molecular Biology**, 23, 1, 235-239. 2000.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA– IBGE / LSPA (2011) Levantamento Sistemático da Produção agrícola.  
[www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/.../lspa\\_201102.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/.../lspa_201102.pdf). access in :June 20, 2012.

LIMA, I.O., SANTOS, T.C.R., JUNIOR, O.P.A. Spectrophotometric Procedure for Determination of Trifluralin in Soil. **Cad. Pesq.**, São Luís, v. 17, n. 1. 2010.

MATSUMOTO,S.T.; MANTOVANI, M.S.; MALAGUTTI, M. I.A.; DIAS, A.L.; FONSECA, I.C.; MARIN-MORALES, M.A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, 29, 1, 148-158 2006.

MARTINS, S.E.; BIANCHINI, A. Toxicity tests aiming to protect Brazilian aquatic systems: current status and implications for management. **J. Environ. Monit.** 13:18-66, 2011.

MANOHARAN, K. AND BANERJEE, M. R. b-Carotene reduces sister chromatid exchange induce chemical carcinogens in mouse mammary cells in organ culture. **Cell Biol. Int. Rep.**, 9, 783–789.1985.

MIRON, D.S.; PRETTO, A.; CRESTANI, M.; GLUSCZAK, L.; SCHETINGER, M.R.; LORO, V.L.; MORSCH, V.M. Biochemical effects of clomazone herbicide on piava (*Leporinus obtusidens*). **Chemosphere**, 74: 1-5. 2008.

MONKIEDJE, A., ANDERSON, A.C., ENGLANDE, A.J. Acute toxicity of Phytolacca dodecandra (Endod-S) and Niclosamide to snails, Schistosoma mansoni cercaria, Tilapia fish, and soil microorganisms. **Environmental Toxicology and Water Quality**. V.6, Issue 4, p. 405-413.1991.

MORAES, B.S.; GLUSCZAK, L.; PRETTO, A.; MENEZES, C.; MARCHEZAN, E.; MACHADO, S.O.; LORO, V.L. Effects of four rice herbicides on some metabolic and toxicology parameters of teleost fish (*Leporinus obtusidens*). **Chemosphere** 68:1597–1601, 2007.

MOSSESO, P., ANGELETTI, D., PEPE, G., PRETTI, C., NASCETTI, G., BELLACIMA, R., CIMMARUTA, R., JHA, N.A. The use of cyprinodont fish, *Aphanius fasciatus*, as a sentinel organism to detect complex genotoxic mixtures in the coastal lagoon ecosystem. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. 742, 31-36.2012.

KONEN, S., CAVAS, T., Genotoxicity testing of the hericide trifluralin and its commercial formularion Treflan using the piscine micronucleus test. **Environ. Mol. Mutagen.** 49 (6), 434–438. 2008.

KOBAYASHI, H., SUGIYAMA, C., MORIKAWA, Y., HAYASHY, M. AND SOFUNI, T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. **MMS Commun.**, 3, 103–115. 1995.

OSMAN, A.G.M.; ABUEL-FADL, K. Y.; KLOAS, W. In situ evaluation of the genotoxic potential of the river Nile: II. Detection of DNA strand-breakage and apoptosis in *Oreochromis niloticus niloticus* (Linnaeus, 1758) and *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). **Mutation Research** 747, 14– 21. 2012.

PRETTO,A.; LORO,V.L.; MENEZES,C.; MORAES, B.S.; REIMCHE,G.B.; ZANELLA,R.; AVILA, S.A. Commercial formulation containing quinclorac and metsulfuron-methyl herbicides inhibit acetylcholinesterase and induce biochemical alterations in tissues of *Leporinus obtusidens*. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 74, 336–341. 2011.

POLEKSICH, V.; KARAN, V. Effects of Trifluralin on Carp: Biochemical and Histological Evaluation. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 43, 213-221. 1999.

RESGALLA Jr., C., NOLDIN, J.A., SANTOS, A.L., SATO, G. & EBERHARDT, D.S. 2002. Toxicidade aguda de herbicidas e inseticidas utilizados na cultura de arroz irrigado sobre juvenis de carpa (*Cyprinus carpio*). **Pest.: Rev. Ecotox. Meio Amb.** 12(1):59-68.

ROCHA, C.A.M.; CUNHA, L.A.; PINHEIRO, R.H.S.; BAHIA, M.O.; BURBANO, R.M.R. Studies of micronuclei and other nuclear abnormalities in red blood cells of *Colossoma macropomum* exposed to methylmercury. **Genetics and Molecular Biology**, 34, 4, 694-697. 2011.

ROCHA, C.A.M.; CUNHA, L.A.; PINHEIRO, R.H.S.; BAHIA, M.O.; BURBANO, R.M.R. Genotoxic effects of methylmercury on the fish *colossoma macropomum* (characiformes: characidae) as evaluated using the comet assay. **UAKARI**, v. 7, n. 2 , p. 23- 28, 2011.

RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. Mutagênese Ambiental. Editora da ULBRA. Canoas-RS. 356pp. 2003.

RIBEIRO, K.A.L., CARVALHO, C.M., MOLINA, M.T., LIMA, E.P., LOPEZ-MONTERO, E., REYS, J.R.M., OLIVEIRA, M.B.F., PINTO, A.V., SANTANA, A.E.G., GOULART, M.O.F. Activities of naphthoquinones against *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae), vector of dengue and *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), intermediate host of *Schistosoma mansoni*. **Acta Tropica**, 111, 44-50. 2009.

SINGH, N. A Simple Method for Accurate Estimation of Apoptotic Cells. **Experimental Cell Research**. 256, 328–337. 2000.

SINGH, N. P., MCCOY, M. T., TICE, R. R. AND SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell Res.**, 175, 184–491. 1988.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ. Mol. Mutagen.**, 35, 206-221. 2000.

VICARI,T.; FERRARO,M.V.M.; RAMSDORF,W.A.; MELA,M.; RIBEIRO,C.A.O.; CESTARI, M.M. Genotoxic evaluation of different doses of methylmercury (CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup>) in *Hoplias malabaricus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 82, 47–55, 2012.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos neste estudo foi possível concluir que:

A toxicidade da trifluralina estudada neste trabalho mostrou a influência do herbicida e do seu solvente. Os resultados demonstraram que os solventes geralmente considerados como ingredientes inertes nas formulações comerciais de herbicida também podem ter um grande efeito biológico. A exposição de *C. macropomum* para uma formulação contendo a trifluralina pura solubilizada em solução de DMSO inibiu ChE cerebral e muscular com efeito dose-dependente. Embora a exposição a trifluralina neste experimento não levou os animais a risco letal. Os juvenis de *C. macropomum* mostraram natação errática, tremores e letárgia do início ao final da contaminação de 96 horas.

Sob condições *in vitro*, ChE do cérebro de *C. macropomum* apresentou sensibilidade muito elevada para o carbamato de eserina agente anticolinesterasico e sensibilidade moderada ao herbicida trifluralina. Em conclusão, a ChE cerebral de juvenil *C. macropomum* pode ser usada como um marcador biológico em programas de biomonitoramento no delta do rio São Francisco e em outros rios do Brasil. Devido, *C. macropomum* ser uma espécie abundante durante todo o ano no delta, e perfeitamente adaptada as condições ambientais dessa região pode ser indicada à espécie sentinela.

Esses resultados indicam a necessidade de novos estudos, com herbicidas puros contra formulações comerciais para esclarecer impactos biológicos do estresse oxidativo e da expressão de genes de resposta ao estresse celular. Finalmente, os resultados da electroforese de coloração ativa em conjunto com os ensaios de inibição com Iso-OMPA sugerem a presença de acetilcolinesterase e butirilcolinesterase no cérebro de *C. macropomum*.

Quanto as propriedades mutagênicas e genotóxicas do herbicida trifluralina a investigação demonstrou que o tipo de alteração genotóxica variou de acordo com a concentração do agroquímico. Contudo, foi possível detectar a menor concentração com efeito significativo ou observado o NOEL que foi de (1,5  $\mu\text{mol} / \text{L}$ ) para os juvenis de *Colossoma macropomum* expostos por 96 h.

O *C. macropomum* mostrou-se sensível quanto aos parâmetros bioquímicos analisados, atividade enzimática,  $\text{CI}_{50}$  e caracterização da ChE cerebral; podendo destacar ainda os efeitos genotóxico, mutagênicos e apoptóticos como tendo maior relevância para avaliar a toxicidade da trifluralina para essa espécie de peixe.

## 7. PERSPECTIVAS

Na projeção de metas de continuidade deste trabalho, deve ser considerado que: É uma área de pesquisa relativamente nova no Brasil e precisamente na região Nordeste carente de projetos e recursos humanos direcionados para essa área de estudo, que requer a interface de várias áreas do conhecimento e laboratorial para execução dos métodos analíticos e de biologia celular.

Em função dos resultados, algumas propostas de continuidade do trabalho:

- Realizar a separação das duas colinesterases acetil e butiril encontradas no cérebro, para realizar a purificação da Acetilcolinesterase em *C.macropomum* e assim testar sua sensibilidade individual.
- indicar *C. macropomum* a sentinela ao banco de dados de espécie de peixes de água doce utilizadas em biomonitoramento ambiental.

# **ANEXOS**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

Maceió – AL, 25/01/2012

Senhor (a) Pesquisador (a), Fabiana Caxico de Abreu Galdino  
Jaqueline Maria da Silva  
Edma Carvalho de Miranda  
Sonia Salgueiro Machado  
Antonio Euzébio Goulart Santana  
Bruno Anderson Matias da Rocha

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), em 25/01/2012 e com base no parecer emitido pelo (a) relator (a) do processo nº 024854/2010-11 sob o título, **Avaliação de genotoxicidade, bioquímica e fisiológicas do tabaqui (*Colossoma macropomum*) exposto ao herbicida trifluralina**, vem por meio deste instrumento comunicar a aprovação do processo supra citado, com base no item VIII.13, b, da Resolução nº 196/96.

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS 196/96, item V.4).

É papel do(a) pesquisador(a) assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

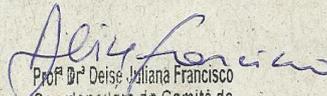
Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e sua justificativa. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o(a) pesquisador(a) ou patrocinador(a) deve enviá-los à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem incluídas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item IV. 2.e).

Relatórios parciais e finais devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos no Cronograma do Protocolo e na Res. CNS, 196/96.

Na eventualidade de esclarecimentos adicionais, este Comitê coloca-se a disposição dos interessados para o acompanhamento da pesquisa em seus dilemas éticos e exigências contidas nas Resoluções supra - referidas.

Esta aprovação não é válida para subprojetos oriundos do protocolo de pesquisa acima referido.

(\*) Áreas temáticas especiais  
Válido até: Janeiro de 2013.

  
Prof.ª Dr.ª Deise Juliana Francisco  
Coordenadora do Comitê de  
Ética em Pesquisa -UFAL