



UFAL

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

FÁTIMA LÚCIA DE BRITO DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS E GENOTÓXICOS NA
ESPÉCIE *Serrasalmus brandtii* (Lutken, 1865) CAPTURADA NO
RESERVATÓRIO ITAPARICA - PE/BA.**

MACEIÓ
2014

Universidade Federal de Alagoas

**Campus A. C. Simões
Tabuleiro do Martins
57072-970 - Maceió-AL**

FÁTIMA LÚCIA DE BRITO DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS E GENOTÓXICOS NA
ESPÉCIE *Serrasalmus brandtii* (Lutken, 1865) CAPTURADA NO
RESERVATÓRIO ITAPARICA - PE/BA.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências, com área de concentração em Biotecnologia.

Orientador(a): Prof. Dr. Fabiane Caxico de Abreu Galdino

Co-orientador(a): Prof. Dr. Sônia Salgueiro Machado

MACEIÓ

2014

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

Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade

- S237a Santos, Fátima Lúcia de Brito dos.
Avaliação de biomarcadores bioquímicos e genotóxicos na espécie *Serrasalmus brandtil* (Lutken, 1965) capturada no reservatório Itaparica – PE/BA / Fátima Lúcia de Brito dos Santos. – 2014.
104 f. : il. tabs e gráfs.
- Orientadora: Fabiane Caxico de Abreu Galdino.
Coorientadora: Sonia Salgueiro Machado.
Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal de Alagoas.
Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia. Maceió, 2014.
- Bibliografia: f. 78-88.
Apêndices: f. 89-92.
Anexos: f. 93-104.
1. Peixes. 2. Biomarcadores. 3. acetilcolinesterase. 4. Micronúcleo.
5. Butirilcolinesterase. 6. Ensaio cometa. I. Título.
- CDU: 547



FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese do Doutorando **FÁTIMA LÚCIA DE BRITO DOS SANTOS**, intitulada: “**Avaliação de Biomarcadores Bioquímicos e Genotóxicos na Espécie *Serrasalmus brandtii* (Lutken, 1865) Capturada no Reservatório Itaparica - PE/BA**”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 04 de setembro de 2014, às 13h, na Sala de Aulas do PPGQB/IQB/UFAL.

COMISSÃO JULGADORA

Fabiane Caxico de Abreu Galdino

Fabiane Caxico de Abreu Galdino

Orientadora (PPGQB/IQB/UFAL)

Sonia Sanguero Machado

Sonia Sanguero Machado

Co-orientadora (PPGQB/IQB/UFAL)

Bruno Rocha

Bruno Anderson Matias da Rocha

(UFC, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular)

Paulo Guilherme Vasconcelos de Oliveira

Paulo Guilherme Vasconcelos de Oliveira

(UFRPE - Departamento de Engenharia de Pesca e Aquicultura)

Elton Lima Santos

Elton Lima Santos

(CECA/UFAL)

Hugo Juarez Vieira Pereira

Hugo Juarez Vieira Pereira

(PPGQB/IQB/UFAL).

Esta tese é dedicada aos meus pais:
Valdemar (*in memoriam*) e Nasarene, aos quais tudo devo.

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Fabiane Caxico de Abreu Galdino, minha orientadora e amiga, por ter acreditado em minha proposta de trabalho e dedicado seu tempo em me orientar, sempre disponível, tranqüila e bem humorada;

À Professora Dra. Sonia Salgueiro Machado, minha co-orientadora e amiga, pelos ensinamentos, confiança e dedicação a mim dispensados;

Ao Instituto de Química e Biotecnologia (IQB) e ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia (PPGQB) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL);

Aos professores do PPGQB, em especial, à querida Professora Dra. Marília Oliveira Fonseca Goulart, sempre atenciosa e carinhosa para comigo e ao Professor Dr. Vitor Lima;

Ao Instituto de Ciências Biológica e Saúde (ICBS), na pessoa do Professor Dr. Renato Santos Rodarte, como também suas orientandas Heloisa Matos e Tayhana Medeiros pela parceria de trabalho com o Ensaio Cometa;

Aos professores doutores que compuseram a banca examinadora de defesa desta tese: Hugo Pereira, Elton Santos, Paulo Oliveira, Bruno Rocha, Francis Gomes e Luciano Grillo pelas muitas contribuições;

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia Vegetal e Enzimologia da UFAL que muito contribuíram para realização do meu trabalho, tanto nas atividades de bancada quanto nas coletas de campo (duras coletas!!!), sempre disponíveis: Dra. Jaqueline Maria da Silva, Roseane Alves, Giovanni Leoncini, Pedro Cavalcanti, Isadora Ribeiro, Sarah Rhubia, Antonio Thomás, Humberto Tenório, Cledson e Juliana, João, Amanda, Emerson e Ricardo.

Aos amigos do Laboratório de Eletroquímica que me acolheram e sempre me trataram com carinho, atenção e dedicação: Camila Calado (Camilíssima), Juliana Santos (prima), Gabriela Corti (Gabi), Ana Julia, Andresa, Anny, Andrea Claudia, Fabrícia, Kelly, Marília e Victor, Elton, Leonardo (Leo fish), Angladis, Gleidson, Cleylton,

Aos técnicos administrativos do IQB, em especial, aos queridos Aldy dos Santos e Rejane Montenegro;

Aos funcionários terceirizados do IQB, pessoas maravilhosas que conheci: Geruza, Rosilda, Eliete, Cida, Jovem, Nice, Elieje, sempre bem humorados e disponíveis;

Aos professores João Gomes, Marcos André Rodrigues e Roseane Alves pela colaboração no tratamento estatístico dos dados;

À Universidade do Estado da Bahia (UNEB), a qual sou vinculada como professora do curso de Engenharia de Pesca, em especial ao meu querido reitor, Prof. Lourivaldo Valentim, pela liberação das minhas atividades acadêmicas e concessão de bolsa;

À Companhia Hidro Elétrica do São Francisco (CHESF), na pessoa do meu amigo, Pesquisador Dr. José Patrocínio Lopes, responsável pela Estação de Piscicultura de Paulo

Afonso (EPPA) pela gentil doação de exemplares de peixes e utilização das instalações; como também ao Engenheiro de Pesca Thiago Vieira de Aragão (Departamento de Recursos Hídricos e Recursos Energéticos – DHE) pela disponibilização dos dados pluviométricos;

Outras pessoas especiais, também grandes amigos que fiz na UFAL, que me receberam de braços abertos, me ensinaram química, me apoiaram, também me incentivaram e que vou sentir muitas saudades: Andrea Lopes (Dea), Carla Karine (vizinha), Isis Torres (Isi), Givanildo Santos (Giva), Cenira Carvalho (Cê)...

Ao casal Marcos André (Junho) e Carla Karine por todo carinho, amizade, apoio, atenção e dedicação. Sem eles a jornada teria sido mais difícil;

A um trio de mulheres especiais pelo apoio em todos os momentos, minhas amigas Susu, Thaysa e Isis;

Aos amigos, companheiros de trabalho da UNEB e incentivadores para realização deste doutorado Prof. Dra. Eliane Maria Nogueira e Prof. Dr. Edilson Alves;

À amiga Noemi (Nosinha querida), pessoa primordial para realização da minha pesquisa de campo.

Às comunidades de reassentados do reservatório Itaparica, em especial aos pescadores Jurandir (Galego), Nildo e Sr. Raimundo, pessoas simples, gentis e disponíveis; Também ao Sr. João Luiz, pelas informações imprescindíveis referentes àquela localidade;

Ao meu esposo Tony, companheiro em todos os momentos, sempre disponível, compreensivo e acima de tudo grande incentivador para realização do doutorado;

Às amigas que muito colaboraram com estratégias burocráticas em minha Universidade (UNEB): Profa. M.Sc. Susana Luz, Helena Nunes, Rose Neves, Vera Lucia, Elaine Cristina e ainda Fabíula Bezerra (ex-aluna e grande amiga!!) sempre disponível a cada solicitação que fiz;

À minha família, meu porto seguro, onde busquei apoio e conforto nos momentos de insegurança e solidão, em especial aos meus pais Nasarene (minha Nasa amada, guerreira, maravilhosa: te amo!!!!) e Valdemar (*in memoriam*); irmãos amados Ricardo, Everaldo, Gaspar e Rosa; sobrinhos lindos Henrique, Ariele, Gabriel, André Ricardo, Ana Gabriela e Arthur Vinicius, filha Gilmara, genro Daniel e netinha Sofia (meu pinguinho de gente!!);

Ao meu Deus, onipotente e onipresente, sempre!!!

RESUMO

Ambientes aquáticos são ecossistemas que mais sofrem impactos causados pela ação antropogênica, uma vez que constitui compartimentos finais de vários produtos gerados pela atividade humana. O presente trabalho avaliou a espécie de peixe *Serrasalmus brandtii* (pirambeba), coletada em dois sítios no reservatório Itaparica (Brasil) durante o período de março/12 a janeiro de 2013 através de biomarcadores bioquímicos e genotóxicos. No entorno do reservatório existem reassentamentos com práticas agrícolas empregando agroquímicos. Desta forma, o trabalho visou a utilização de *S. brandtii* como sentinela no rio São Francisco. Não houve diferença marcante nos parâmetros físico-químicos temperatura e oxigênio dissolvido mensurados ao longo do período amostral. Entre os parâmetros morfológicos, as massas dos espécimes variaram entre os meses de amostragem. Foi realizada quantificação de atividade acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE) cerebral e muscular de espécimes coletados nos dois sítios. AChE cerebral de pirambeba coletada no sítio 1 apresentou decaimento significativo na atividade específica ao longo do período estudado, no entanto o conteúdo protéico não mostrou o mesmo perfil. A atividade específica BChE cerebral mostrou variação significativa durante o período de amostragem. Todavia, pirambeba coletada no sítio 2 não mostrou diferença significativa na atividade específica de AChE cerebral e conteúdo protéico. BChE cerebral nesses espécimes apresentou variação significativa nos valores de atividade específica. No tecido muscular, pirambeba coletada no sítio 1 apresentou variação significativa nos valores de atividade específica AChE, bem como conteúdo protéico durante período amostrado. A atividade específica de BChE muscular também teve variação significativa. Espécimes coletadas no sítio 2 apresentaram variação significativa na atividade específica da AChE muscular e no conteúdo protéico ao longo do período estudado. Para valores de atividade de BChE muscular, os resultados apresentaram um padrão semelhante ao observado no sítio 1. Os ensaios genotóxicos foram realizados em eritrócitos de pirambeba coletadas nos dois sítios. Os resultados mostraram frequência de micronúcleos (MN) e variação significativa entre as frequências de MN foi observada ao longo do período estudado. Anormalidades nucleares (AN) também foram analisadas e resultados indicaram que espécimes do sítio 1 tiveram maiores frequências de AN do que espécimes do sítio 2. O ensaio Cometa indicou que a maioria dos núcleos de eritrócitos analisados nos dois sítios apresentou dano na classe 1, indicando danos leves no DNA das células. Estudos *in vitro* foram também realizados para caracterização de AChE cerebral de pirambeba e ensaios cinéticos mostraram valores de $0,324 \pm 0,04$ mmol/L e $0,709 \pm 0,014$ mmol/min⁻¹.mg de proteína para constantes cinéticas aparentes K_m^{app} e $V_{máx}^{app}$, respectivamente. Ensaios inibitórios de AChE mostraram que AChE muscular ($0,362 \pm 0,2$) foi mais sensível ao carbamato de eserina que a AChE cerebral ($0,887 \pm 0,1$) e quando comparados AChE cerebral entre a eserina ($0,887 \pm 0,1 \mu\text{M}$) e o glifosato ($2,276 \pm 0,02 \mu\text{M}$), verificou-se uma maior sensibilidade para a AChE cerebral com eserina. Concluímos que dentre os biomarcadores genotóxicos testados, os resultados mostraram que teste de MN foi considerado o mais sensível; a espécie *S. brandtii* pode ser a espécie sentinela para a região do submédio São Francisco, visto que esteve presente no rio em todas as coletas, mesmo durante o período mais rigoroso de estiagem e baixo nível da água, como também por apresentar relação direta com a atividade de AChE e a formação de MN.

Palavras chave: Peixes, colinesterases, teste do micronúcleo, ensaio Cometa.

ABSTRACT

Aquatic environments are ecosystems that most affected impacts caused by anthropogenic action, since it is the final compartments of various products produced by human activity. This study evaluated the fish specie *Serrasalmus brandtii* (pirambeba), collected at two sites in the Itaparica reservoir (Brazil) during March/12 to January/2013 through biochemical and genotoxic biomarkers. Around the reservoir resettlement areas exist with agricultural practices using agrochemicals. Thus, the study aimed to use *S. brandtii* as specie sentinel for this region of the Sao Francisco river. There was no significant difference in the physicochemical parameters measured such as temperature and dissolved oxygen over the sample period. Among the morphological parameters, the masses of the specimens varied between sampling period. Acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) activities were quantify on the brain and muscle specimens collected from the two sites. Brain AChE from pirambeba collected at site 1 showed a significant decay in specific activity over the study period, however protein content did not show the same profile. Brain BChE specific activity had significant variation during the sampling period. On the contrary, pirambeba collected at site 2 showed no significant difference in the brain AChE specific activity and protein content. Brain BChE of these specimens showed significant variation on the specific activity values. On muscle tissue, pirambeba collected at site 1 showed significant variation in the values of AChE specific activity as well as on the protein content during the sample period. BChE specific activity on the muscle also had significant variation. Pirambeba collected at site 2 showed significant variation on muscle AChE specific activity and protein content values over the analyzed period. For muscle BChE activity, values, the results showed pattern similar to the one observed on site 1. Genotoxicity assays were performed on pirambeba erythrocyte cells collected at two sites. The results showed frequency of micronuclei (MN) and significant variation between the mean frequencies of MN over the study period was observed. Nuclear abnormalities (NA) were also analyzed and the results indicated that pirambeba the site 1 had higher nuclear abnormalities frequencies than the pirambeba from site 2. The Comet assay indicated that majority of erythrocyte nuclei analyzed from both sites shown class 1 damage indicating slight DNA damage. In vitro studies were also performed for the characterization of brain AChE from pirambeba and kinetic assays showed values of 0.324 ± 0.04 mmol /L and 0.709 ± 0.014 mmol / min⁻¹.mg protein for the apparent kinetic constants K_m^{app} and $V_{m\acute{a}x}^{app}$ respectively. Brain AChE inhibitory assays showed that muscle AChE (0.362 ± 0.2 μ M) was more sensitive to carbamate eserine than brain AChE (0.887 ± 0.1 μ M) AChE and when compared brain AChE between eserine ($0.887 \pm 0,1$ μ M) and glyphosate ($2,276 \pm 0,02$ μ M), there was a greater sensitivity for brain AChE with eserine. We conclude that among the biomarkers genotoxic tested, the results showed that the MN test was considered the most sensitive; *S. brandtii* specie can be a specie sentinel for the submedium San Francisco region, since was present in all samples of the river, even during the most severe period of drought and low water level, but also by having a direct relationship with the AChE activity and forming MN.

Key words: Fish, cholinesterase, micronucleus test, Comet assay.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplar de <i>Serrasalmus brandtii</i> (Lutken, 1865), popularmente conhecida como pirambeba capturado no reservatório Itaparica, submédio São Francisco, no período de mar/12 à jan/13.....	21
Figura 2- Exemplar de <i>Prochilodus brevis</i> (Steindachner, 1875) comumente conhecida por curimatã capturado no reservatório Itaparica, submédio São Francisco, em mar/12 e set/12.....	22
Figura 3 - Exemplar de <i>Astronotus ocellatus</i> (Agassiz,1831) comumente conhecida por apaiari capturado no reservatório Itaparica, submédio São Francisco, em mar/12 e nov/12.....	23
Figura 4 - Vista aérea da represa Luiz Gonzaga, também conhecida por reservatório Itaparica localizado entre os Estados de Pernambuco e Bahia, na região fisiográfica do submédio São Francisco.....	25
Figura 5 - Reservatório Itaparica localizado entre os Estados de Pernambuco e Bahia, na região fisiográfica do submédio São Francisco.....	25
Figura 6 - Classificação dos níveis de fragmentação do DNA segundo o grau de lesão.....	32
Figura 7 - Localização dos pontos de amostragens do sítio 1 situado no reservatório Itaparica – PE/BA.....	36
Figura 8 - Localização dos pontos de amostragens do sítio 2 situado no reservatório Itaparica – PE/BA.....	36
Figura 9 - Extração do cérebro de pirambeba (<i>S. brandtii</i>).	39
Figura 10 - Preparação do extrato (homogenato de células). A - Extração do cérebro; B - Pesagem dos cérebros; C – Maceração dos cérebros; D – Obtenção do extrato.	40
Figura 11 - Panorama do baixo nível de água do reservatório Itaparica em jan/13 no sítio de amostragem 1.....	47
Figura 12 - Panorama do baixo nível de água do reservatório Itaparica em jan/13 no sítio de amostragem 2.....	48
Figura 13 - Oxigênio dissolvido (mg/L) (média e desvio padrão) mensurado nos sítios de amostragem localizados no reservatório Itaparica– PE/BA no período de mar/12 a jan/13.	49
Figura 14 - Temperatura (°C) (média e desvio padrão) mensurado nos sítios de amostragem localizados no reservatório Itaparica– PE/BA no período de mar/12 a jan/13.	50
Figura 15 – Massas (média e desvio padrão) de exemplares de <i>S. brandtii</i> coletados no reservatório Itaparica-PE/BA no período de mar/12 a jan/13.....	50
Figura 16 - Comprimentos (média e desvio padrão) de exemplares de <i>S. brandtii</i> coletados no reservatório Itaparica-PE/BA no período de mar/12 a jan/13.....	51
Figura 17 - Inibição de atividade AChE em cérebro de <i>S. brandtii</i> em diferentes concentrações de acetiltiocolina usando eserina como inibidor	61

Figura 18 - Inibição de atividade AChE em cérebro de <i>S. brandtii</i> em diferentes concentrações de acetiltiocolina usando glifosato como inibidor.	62
Figura 19 - Inibição de atividade AChE em músculo de <i>S. brandtii</i> em diferentes concentrações de acetiltiocolina usando eserina como inibidor.	62
Figura 20 - Comportamento cinético de AChE cerebral de <i>S. brandtii</i> em presença de acetiltiocolina.....	63
Figura 21- Células de eritrócitos de pirambeba (<i>S. brandtii</i>): A) sem formação de MN e B) com MN formados.	66
Figura 22 - Distribuição das frequências de micronúcleos (média e desvio padrão) encontrados em eritrócitos de pirambeba (<i>S. brandtii</i>) capturadas nos dois sítios de coleta localizados no reservatório Itaparica PE/BA no período de mar/12 à jan/13. .	67
Figura 23 - Anormalidades nucleares a) célula com núcleo notched; b) célula com núcleo blebbed; c) célula com núcleo lobed; d) célula com núcleo vacuolated.....	68
Figura 24 - Índice de danos (ID) obtidos de eritrócitos de <i>S. brandtii</i> nos dois sítios de coleta no período entre mar/12 e nov/12.....	71
Figura 25 - Ensaio cometa: células de sangue da espécie <i>S. brandtii</i> mostrando as classes de danos visualizadas. (A) Imagem com aumento de 200x; (B) Imagem com aumento de 400x.....	72
Figura 26 - Perfil da AChE cerebral e o teste de micronúcleo em eritrócitos de <i>S. brandtii</i> ao longo do período amostrado.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividades AChE e BChE em homogenato de células de cérebro de <i>S. brandtii</i> (pirambeba) coletadas no Sítio 1 no período de março/12 a novembro/12 localizado no reservatório Itaparica-PE/BA.	53
Tabela 2 - Atividades AChE e BChE em homogenato de células de cérebro de <i>S. brandtii</i> (pirambeba) coletadas no Sítio 2 no período de mar/12 a jan/13 localizado no reservatório Itaparica - PE/BA.	55
Tabela 3 - Atividades AChE e BChE em homogenato de células de músculo de <i>S. brandtii</i> (pirambeba) coletadas no Sítio 1 localizado no reservatório Itaparica - PE/BA.	58
Tabela 4 - Atividades AChE e BChE em homogenato de células de músculo de <i>S. brandtii</i> (pirambeba) coletadas no Sítio 2 localizado no reservatório Itaparica - PE/BA.	58
Tabela 5 - Valores de IC ₅₀ obtidos para AChE cerebral e muscular de <i>S. brandtii</i> com os inibidores carbamato de eserina (fisostigmina) e glifosato.	60
Tabela 6 - Comparação da constante aparente de Michaelis–Menten (Km), velocidade máxima (Vmax) e valores de IC ₅₀ da acetilcolinesterase cerebral de pirambeba (<i>S. brandtii</i>) usando acetiltiocolina como substrato e eserina como inibidor.	65
Tabela 7 - Frequência média de alterações morfológicas nucleares em eritrócitos de <i>S. brandtii</i> separadas entre blebbed, lobbed, notched e vacuolated.	70
Tabela 8 - Frequências das classes de cometa de pirambeba coletadas no sítio 1 localizado no reservatório Itaparica - PE/BA durante o período de mar/12 a nov/12.	73
Tabela 9 - Frequências das classes de cometa de pirambeba coletadas no sítio 2 localizado no reservatório Itaparica - PE/BA durante o período de mar/12 a nov/12.	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AChE	Acetilcolinesterase
ATCh	Acetiltiocolina
ACh	Acetilcolina
AN	Anormalidades nucleares
ANOVA	Análise de variância
BChE	Butirilcolinesterase
BuTCh	Butiriltiocolina
ChE	Colinesterase
CHESF	Companhia Hidro Elétrica do São Francisco
DTNB	Ácido 5,5- Ditiobis-[2-nitrobenzóico]
EC	Ensaio do Cometa
IC50	Concentração Inibitória em 50% dos organismos expostos
MN	Micronúcleo
K_m^{app}	Constante de afinidade aparente
V_{max}^{app}	Velocidade máxima aparente
ϵ	Coeficiente de extinção da reação
°C	Graus Celsius
μg	Microgramas
μL	Microlitros
DNA	Ácido desoxirribonucléico
M	Molar
mg.L^{-1}	Miligrama por litro
min	Minuto
mL	Mililitros
μM	MicroMolar
mM	MiliMolar
pH	Potencial hidrogeniônico
ppm	Partes por milhão (mg.L^{-1})

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	17
2.1	Objetivo Geral	17
2.2	Objetivos Específicos	17
3	REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1	Contaminação em Ambientes Aquáticos	18
3.2	Peixes como Bioindicadores de Qualidade Ambiental	19
3.2.1	Caracterização das espécies	20
3.2.1.1	Espécie <i>Serrasalmus brandtii</i> (Lutken, 1865)	20
3.2.1.2	Espécie <i>Prochilodus brevis</i> (Steindachner, 1875)	21
3.2.1.3	Espécie <i>Astronotus ocellatus</i> (Agassiz, 1831)	22
3.3	Área de Estudo	24
3.3.1	Reservatório Itaparica	24
3.4	Biomarcadores	26
3.4.1	Atividade das colinesterases (ChEs)	28
3.4.2	Teste do micronúcleo	29
3.4.3	Ensaio Cometa	31
3.5	Biomonitoramento de Ambientes Aquáticos	33
4	MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1	Produtos Químicos	35
4.2	Área de Estudo	35
4.3	Espécies Escolhidas para Estudo	37
4.4	Amostras de Campo	37
4.4.1	Tratamento das amostras	38
4.5	Preparação de Extratos dos Tecidos do Peixe	39
4.6	Determinação de Atividade da Enzima ChE	40
4.7	Quantificação de Proteína	41
4.8	Caracterização de AChE	42
4.8.1	Inibição de AChE	42
4.8.2	Parâmetros cinéticos	42
4.9	Teste do Micronúcleo (MN)	43
4.10	Anormalidades nucleares	43

4.11	Ensaio Cometa	44
4.12	Análise Estatística	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	47
5.1	Parâmetros Físico-Químicos e Morfológicos	48
5.2	Avaliações dos Biomarcadores	51
5.2.1	Avaliação da atividade das colinesterases	51
5.3	Caracterização da Atividade de AChE	60
5.3.1	Inibição de AChE	60
5.3.2	Parâmetros cinéticos	63
5.3.3	Avaliação da genotoxicidade através do teste do micronúcleo (MN) e anormalidades nucleares (AN).....	66
5.3.3.1	Teste do micronúcleo (MN).....	66
5.3.3.2	Anormalidades Nucleares (AN).....	68
5.3.4	Avaliação da genotoxicidade através do ensaio do cometa	71
6	CONCLUSÕES	76
7	PERSPECTIVAS	77
	REFERÊNCIAS	78
	APÊNDICE	89
	ANEXOS	93

1 INTRODUÇÃO

Os ambientes aquáticos são utilizados em todo o mundo com distintas finalidades, entre as quais se destacam o abastecimento de água, a geração de energia, a irrigação, a navegação e a aquicultura. Trata-se de um dos ecossistemas que mais sofre impactos causados pela ação antropogênica, uma vez que constitui os compartimentos finais de vários produtos gerados pela atividade humana (AKAISHI, 2003).

Segundo Mozeto e Zagatto (2006), os ambientes aquáticos estão vulneráveis a substâncias químicas, sendo essa vulnerabilidade dependente das propriedades físicas e químicas dos contaminantes e dos produtos resultantes de sua transformação; da concentração desses contaminantes no ecossistema; da duração e do tipo de descargados contaminantes e das propriedades do ecossistema que lhes permitem existir às alterações resultantes da presença dos contaminantes.

Os agroquímicos, contaminantes aquáticos de alto grau, provocam diversos malefícios ao ambiente aquático e conseqüentemente aos seres humanos. Poluição ambiental causada por pesticidas, especialmente nos ecossistemas aquáticos tem sido documentada em todo o mundo e representa um grande problema, tanto em escala local como global (CEREJEIRA et al., 2003; SPALDING et al., 2003).

No Brasil, a expansão agrícola foi caracterizada por falta de planejamento e conseqüente destruição dos recursos naturais. Como resultado dessa expansão, somente na última década houve um aumento de 190% no mercado interno de pesticidas, fazendo do Brasil um recorde mundial no consumo desses produtos (SINDAG, 2009). Entre 2010 e 2011, cerca de 940 toneladas de pesticidas foram usadas em todo território nacional (ANVISA, 2012). Desse modo, há uma necessidade crescente em identificar estes contaminantes e avaliar seu potencial tóxico através de organismos aquáticos.

Os peixes constituem um grupo de grande importância nas avaliações de toxicidade ambiental, pois além de estarem presentes em vários ambientes e apresentarem ampla distribuição geográfica, participam ainda de diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar, sendo considerados como excelentes modelos biológicos de estudo (RODRIGUES et al, 2003) nas áreas de: toxicologia ambiental,

pesquisas genéticas, biomedicina, neurobiologia, endocrinologia e ecologia (BUSSOLARO, 2010), podendo assim assegurar a detecção de alterações ambientais de diferentes escalas de intensidade.

O rio São Francisco, um dos maiores corpos d'água do Brasil, tem uma enorme importância regional dos pontos de vistas ecológico, econômico e social. Conhecido por Velho Chico abrangeo reservatório Itaparica em sua região fisiográfica chamada Submédio São Francisco e se caracteriza por apresentar grande parte dos seus perímetros irrigados com utilização de agroquímicos e ocupações irregulares no seu entorno, lançando efluentes sem tratamento diretamente no reservatório.

Nesse sentido, a preocupação com a contaminação de sistemas aquáticos por agroquímicos e outros xenobióticos como, despejos industriais, esgotos, derramamentos de petróleo e óleo tem crescido progressivamente no meio científico, buscando aprimoramento e desenvolvendo metodologias, com o intuito de compreender melhor o potencial tóxico destes produtos no ambiente aquático.

Os biomarcadores são indicadores biológicos capazes de indicar eventos que precedem os efeitos irreversíveis de contaminantes ao ambiente e/ou aos organismos, permitindo, por meio de análises relativamente simples, fornecerem uma indicação geral prévia de contaminação (LINDE-ARIAS et al, 2005). Estudo com biomarcadores são necessários, pois segundo Jesus e Carvalho (2008) eles permitem identificar interações que ocorrem entre contaminantes e organismos vivos e também possibilitam a mensuração dos efeitos que estes podem causar.

O presente trabalho avaliou o emprego de biomarcadores bioquímicos (atividade colinesterásica) e genotóxicos (teste do micronúcleo, anormalidades nucleares e ensaio Cometa) no monitoramento das espécies de peixes *Serrasalmus brandtii*, *Prochilodus brevis* e *Astronotus ocellatus* como bioindicadores no reservatório Itaparica, buscando investigação de uma espécie sentinela. No entanto, capturas esparsas das espécies *P. brevis* e *A. ocellatus* ocasionadas por mudanças/alterações naquele ambiente aquático, provavelmente em função dos baixos índices pluviométricos ocorridos durante o período de amostragem inviabilizaram a continuidade dos ensaios destas espécies. O mesmo não ocorreu com a *S. brandtii* (pirambema), capturada durante todo o período amostral e portanto, permanecendo no desenvolvimento da

pesquisa. Além disso, nenhuma pesquisa foi desenvolvida até o momento atual na avaliação da referida espécie utilizada como bioindicador por meio de biomarcadores sendo, portanto um estudo inédito e de relevância para a região estudada.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar biomarcadores bioquímicos e genotóxicos na espécie de peixe *Serrasalmus brandtii* (pirambeba), coletadas bimensalmente no reservatório Itaparica localizado na região hidrográfica do sub-médio São Francisco, objetivando encontrar uma espécie sentinela para esta região do rio São Francisco.

2.2 Objetivos Específicos

Quantificar a atividade de colinesterases: acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE) nos tecidos cerebral e muscular da espécie *S. brandtii*, em dois sítios de amostragem no reservatório Itaparica;

Avaliar o efeito inibitório de agroquímicos em AChE de cérebro e músculo da espécie *S. brandtii*;

Avaliar os efeitos citotóxicos através de amostras de sangue periférico da espécie *S. brandtii*, por meio dos testes de micronúcleo, anormalidades nucleares e do ensaio Cometa.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Contaminação em Ambientes Aquáticos

Muitos dos recursos vivos da Terra se encontram em pontos geográficos específicos como, por exemplo, ao longo de grandes rios, manguezais e outras regiões litorâneas (MOORE et al., 2004). Uma vez que cursos hídricos constituem fontes para uso humano, eles também são o destinatário de grandes quantidades de resíduos (GLOVER e SMITH, 2003). Desta forma, com uma frequência cada vez maior, compostos químicos estranhos ao ambiente têm chegado e influenciado a dinâmica dos ecossistemas (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Segundo Livingstone (1998), o ambiente aquático está exposto a processos de poluição causados pela enorme variedade e quantidade de substâncias químicas que ingressam nele chamadas de xenobióticos e sua quantidade e variedade estão em contínuo aumento. A descarga, o acúmulo e a persistência de xenobióticos constituem uma ameaça à vida, uma vez que eles são frequentemente tóxicos e sua presença pode degradar seriamente o ambiente (FLEEGER et al., 2003).

Oheet al., (2004) entendem que os ambientes aquáticos têm sido os depósitos de diferentes tipos de descargas antropogênicas, sendo esses considerados receptores finais de contaminantes liberados no ambiente estando susceptíveis à ação de diversos tipos de contaminantes: quer sejam aéreos, quer cheguem aos corpos d'água por deposição atmosférica, quer sejam contaminantes terrestres que atingem os ambientes aquáticos através do escoamento destes pelas chuvas (DOMINGOS, 2006). A fonte dessa contaminação é muito diversa, indo desde efluentes industriais, processos de drenagem agrícola (fertilizantes, agroquímicos), derrames acidentais e não acidentais de lixos químicos (metais potencialmente tóxicos, compostos orgânicos e inorgânicos) a lixos domiciliares que acabam por chegar a rios e mares, gerando a contaminação dos ecossistemas aquáticos (AKAISHI, 2004).

Estudos relatam que diversos rios estão contaminados por substâncias tóxicas, genotóxicas, mutagênicas e carcinogênicas decorrentes do descarte de efluentes domésticos e industriais além de agroquímicos utilizados em áreas adjacentes aos corpos d'água (TOMITA e BEYRUTH, 2002).

Existe atualmente um consenso universal a respeito da necessidade de monitorar continuamente o teor de contaminantes químicos nos cursos de águas naturais e nos efluentes industriais descarregados nestes recursos hídricos. Não menos importante, é a contribuição da atividade agrícola, dos esgotos sanitários e dos resíduos domésticos (ROSATO, 2001), visto que a biota aquática está constantemente exposta a essa gama de substâncias tóxicas (AKAISHI, 2004).

3.2 Peixes como Bioindicadores de Qualidade Ambiental

O termo bioindicador pode ser definido como a escolha da espécie dada sua sensibilidade ou tolerância a diversos tipos de alterações ambientais, geralmente causadas por ações antropogênicas como poluição orgânica, assoreamento, construção de barragens, pesca predatória, entre outras (AGOSTINHO et al, 2005).

Entre os principais grupos de animais aquáticos pesquisados, os peixes são amplamente representados no Brasil. Menezes et al.(2003) catalogaram 1.297 espécies de peixes marinhos ao longo da costa brasileira, enquanto Buckup et al.(2007) listaram 2.587 espécies de peixes que habitam exclusivamente água doce. No entanto, sabe-se que os sistemas aquáticos brasileiros abrigam mais de 3000 espécies de peixes de água doce (MARTINS e BIANCHINI,2011).

Os peixes são os organismos mais viáveis para controle de poluição nos sistemas aquáticos e são importantes veículos para transferência de contaminantes a população humana e podem indicar uma exposição potencial aos poluentes (AL-SABTI E METCALFE, 1995).

A comunidade de peixes inclui uma variedade de espécies e níveis tróficos que seguramente pode ter reflexo no grau de distúrbio ambiental. Comparados a outros grupos, como invertebrados, os peixes podem fornecer uma maior quantidade de informações. São componentes comuns e familiares nos ecossistemas aquáticos, sendo vistos como excelentes indicadores das condições ambientais, uma vez que podem refletir distúrbios em diversas escalas devido a sua mobilidade (FREITAS e SIQUEIRA-SOUZA, 2009). Os peixes desempenham um importante papel ecológico na cadeia alimentar por causa de sua função como portador de energia dos níveis mais baixos para níveis tróficos superiores (VAN DER OOST et al., 2003).

Organismos pertencentes ao topo da cadeia alimentar, os peixes são comumente utilizados por possuírem intrínseca relação com toda a cadeia inferior,

indicando respostas de efeitos crônicos, acumulativos e persistentes ao nível de cadeia, além de efeitos diretos ao nível do indivíduo (MIRANDA, 2006).

3.2.1 Caracterização das espécies

3.2.1.1 Espécie *Serrasalmus brandtii* (Lutken,1865)

Na bacia do rio São Francisco ocorrem duas espécies da subfamília Serrasalminae: a piranha vermelha *Pygocentrus piraya* (Cuvier, 1820) e a pirambeba *Serrasalmus brandtii* (Lütken, 1865). Constitui um grupo de peixes com dieta, tática de caça e comportamento social bastante diversificado. A pirambeba é um peixe de tamanho médio com um corpo fortemente compactado e alto, encontrada comumente em reservatórios, onde se reproduz (OLIVEIRA et al., 2004) (Figura 01).

Trata-se de uma espécie carnívora com um hábito alimentar preferencialmente ictiófago e são conhecidos como mutiladores predadores porque eles removem as partes do corpo de presas vivas sem matá-lo, possui uma única série de dentes tricúspide e cortantes pré-maxilares e mandibulares (BRITSKI et al.1988). Eles se alimentam de nadadeiras, escamas e outras partes do corpo de suas presas (NICO & TAPHORN, 1988), e também podem ingerir pequeno organismo intacto quando disponível (BISTONI & HARO, 1995). É amplamente propagada na América do Sul se proliferando em ambientes lênticos (BARBOSA, 1980).

As espécies da subfamília Serrasalminae são únicas dentre os Characiformes por possuírem dentes e mandíbula bem adaptados para arrancar pedaços de carne de peixes maiores, ou mesmo de mamíferos. Espécie considerada oportunista com alta resiliência, dado o alto potencial reprodutivo da espécie (FISHBASE, 2004).

Segundo Vazzoler (1996) essa espécie apresenta perfil dorsal côncavo na região occipital, escamas pequenas com 69 a 77 na linha lateral, manchas escuras dispersas pelo flanco, quando jovem apresentam comprimento até 22cm. O período reprodutivo estende-se de setembro a abril. A desova é parcelada, a fecundação é externa e não realiza migração.

Taxonomia da espécie segundo Nelson (2006):

Classe: Actinopterygii

Ordem: Characiformes

Família: Characidae

Gênero: *Serrasalmus*

Espécie: *Serrasalmus brandtii* (Lütken, 1865)

Figura 1 - Exemplar de *Serrasalmus brandtii* (Lutken, 1865), popularmente conhecida como pirambeba capturado no reservatório Itaparica, submédio São Francisco, no período de mar/12 à jan/13.



Fonte: Autora, 2014.

3.2.1.2 Espécie *Prochilodus brevis* (Steindachner, 1875)

A espécie *Prochilodus brevis* é comumente conhecida por curimatã (Figura 2). Apresenta um regime alimentar do tipo iliófago, com ingestão de animais e vegetais. São espécies de ambientes lênticos. Faz parte de um grupo de peixes conhecidos como "peixes de piracema", que sobem os rios para se reproduzir. Esses peixes em alguns casos percorrem trajetos de vários quilômetros até as áreas de reprodução, desovando em águas abertas (ARAÚJO, 1998). Apresentam escamas grandes e rugosas, placa pré-dorsal biespinhosa com um sulco mediano ventral que desce das

nadadeiras ventrais até o ânus. A boca é pequena com lábios grossos providos de denticulos, como foi observado por Sverlij (1993). Espécie originária das bacias nordestinas, disseminadas por todo nordeste e parte do sudeste.

Taxonomia da espécie segundo Nelson (2006):

Classe: Actinopterygii

Ordem: Characiformes

Família: Prochilodontidae

Gênero: Prochilodus

Espécie: *Prochilodus brevis* Steindachner, 1875.

Figura 2- Exemplar de *Prochilodus brevis* (Steindachner, 1875) comumente conhecida por curimatã capturado no reservatório Itaparica, submédio São Francisco, em mar/12 e set/12.



Fonte: Autora, 2014.

3.2.1.3 Espécie *Astronotus ocellatus* (Agassiz, 1831)

A. ocellatus é um ciclídeo originário da Bacia Amazônica (Figura 03), e disseminado desde 1938 em açudes e rios do Nordeste brasileiro pelo do Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS), encontrado em quase todo o país (FONTENELE, 1982).

Apresenta corpo de conformação robusta, achatado lateralmente, com regular altura em relação ao comprimento; região dorsal espessa e sem espinhas intramusculares; cor parda escura ou castanha, com manchas verticais vermelho-claras; nadadeira dorsal e anal com espinhos, nadadeira caudal arredondada; cabeça pequena em relação ao corpo; olhos grandes e linha lateral interrompida. O que caracteriza a espécie é um ocelo quase circular, de cor preta, orlada de vermelho-carmim, localizado no pedúnculo caudal próximo à inserção da nadadeira de mesmo nome (FONTENELE e NEPOMUCENO, 1983).

Classe: Actinopterygii

Ordem: Perciformes

Família: Cichlidae

Gênero: *Astronotus*

Espécie: *Astronotus ocellatus*, Agassiz, 1831.

Figura 3 - Exemplar de *Astronotus ocellatus* (Agassiz, 1831) comumente conhecida por apaiari capturado no reservatório Itaparica, submédio São Francisco, em mar/12 e nov/12.



Fonte: Autora, 2014.

3.3 Área de Estudo

3.3.1 Reservatório Itaparica

O reservatório Itaparica, também conhecido como Luiz Gonzaga (Figura 4), situa-se entre as coordenadas geográficas 9° 6' S e 38° 19'W, em partedo trecho onde o rio São Francisco faz a divisa entreos Estados de Pernambuco e Bahia, na região fisiográfica chamada submédio São Francisco. Integra o complexo hidrelétrico de Paulo Afonso, juntamente com as Usinas Hidrelétricas de Moxotó, PA-I, II, III, PA-IV e Xingó. Foi construído em 1987 com a finalidade prioritária de geração de energia elétrica, contudo apresenta usos múltiplos como abastecimento público e industrial, irrigação, piscicultura, pecuária, navegação, turismo e lazer. Apresenta uma superfície aproximada de 828 km² com uma capacidade de armazenamento na ordem de 10 bilhões de metros cúbicos (CHESF, 2010).

Local escolhido para desenvolvimento do presente trabalho, o reservatório Itaparica possui diversas agrovilas implantadas, abastecidas por sistema de irrigação que servem de base para as populações reassentadas que circundam toda área adjacente. Em seu entorno existem perímetros irrigados utilizando prática agrícola inadequada e ocupações irregulares, uma vez que a adubação química é utilizada em larga escala e também pelo lançamento de efluentes sem tratamento diretamente no reservatório.

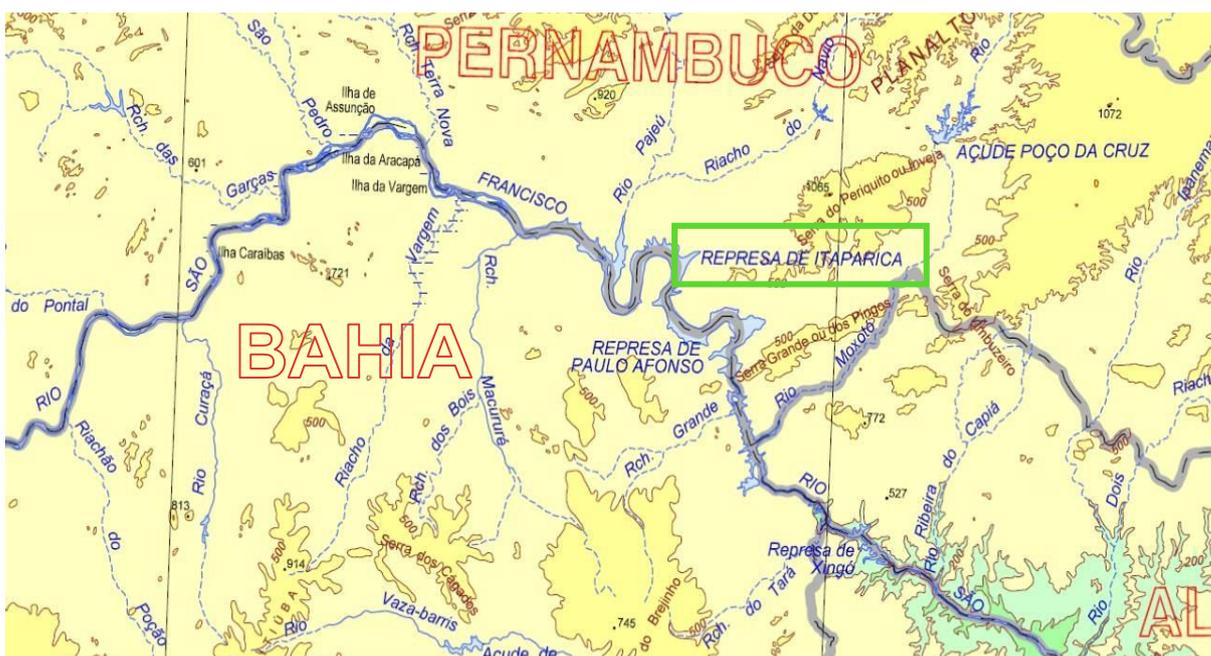
Os projetos de irrigação localizados às margens do reservatório Itaparica se dividem de um lado margeando o Estado de Pernambuco e do lado oposto margeando o Estado da Bahia (Figura 05). Isto vem causando alterações na qualidade da água, sendo necessário um monitoramento periódico e uma adequada gestão deste corpo d'água visando minimizar problemas futuros (MELO, 2007).

Figura 4 - Vista aérea da represa Luiz Gonzaga, também conhecida por reservatório Itaparica localizado entre os Estados de Pernambuco e Bahia, na região fisiográfica do submédio São Francisco.



Fonte: Nunes, Bruno R. C., 2008 – Geoview.info.

Figura 5 - Reservatório Itaparica localizado entre os Estados de Pernambuco e Bahia, na região fisiográfica do submédio São Francisco.



Fonte: IBGE, 2007.

O rio São Francisco, principal afluente do reservatório Itaparica, tornou-se um importante canal de ligação com o interior do Brasil por meio da navegação fluvial entre a sua foz e a região das cachoeiras (complexo Paulo Afonso), no Baixo São Francisco. Abrange 2680 km de extensão e sua bacia ocupa uma área de 631,1 mil km² correspondendo a 7,4% do território nacional. Banha as regiões do nordeste, sudeste e centro-oeste abrangendo parcialmente os estados de Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia, Minas Gerais, Goiás e o Distrito Federal, sendo por isso chamado o rio da Integração Nacional (CODEVASF, 2006).

O rio São Francisco fazdivisa dos estados da Bahia e Pernambuco, atravessa o semi-árido nordestino, tornando-se fundamental para a economia da região, favorecendo a agricultura irrigada, que é caracterizada pelo uso intensivo de agroquímicos (inseticidas, fungicidas, herbicidas e adubos inorgânicos) e mesmo quando utilizados na forma convencionalmente considerada como adequada, invariavelmente causam algum tipo de contaminação do solo e das águas (CODEVASF, 2006). Sua importância deve-se ao grande volume de água que transporta para a região semi-árida do nordeste e a sua contribuição histórica e econômica na fixação de populações ribeirinhas e criação das cidades que surgiram ao longo do seu vale (MMA, 2006).

3.4 Biomarcadores

A entrada crescente de contaminantes aos ecossistemas aquáticos gerou a necessidade de compreender e avaliar os efeitos biológicos de poluentes sobre a biota aquática. Neste sentido, um grande número dos estudos utilizou biomarcadores como ferramentas funcionais para avaliar a toxicidade de tais compostos para populações naturais (VAN DER OOST et al., 2003; ALPUCHE-GUAL e GOLD-BOUCHOT, 2008; RODRIGUES et al., 2011).

Inúmeros trabalhos utilizam biomarcadores na avaliação dos efeitos de substâncias tóxicas no ambiente aquático. Estes biomarcadores podem ser capazes de fornecer um sinal de alerta precoce bem antes que a degradação ambiental já tenha ocorrido (MOUNEYRAC & AMIARD-TRIQUET, 2013).

Muitas definições têm sido recomendadas para o termo biomarcador. Segundo Lama e Gray (2003) biomarcadores são ferramentas sensíveis para medição de efeitos biológicos na avaliação da qualidade ambiental. Adams (2002) define ainda

biomarcadores como alterações biológicas que expressam a exposição e/ou efeito tóxico de poluentes presentes no ambiente. Para Van Der Oost et al., (2003) biomarcadores representam qualquer alteração bioquímica, fisiológica e comportamental que podem modificar o bem-estar de um organismo. Dessa forma, vários componentes moleculares e celulares em diferentes espécies de peixes têm sido utilizados como biomarcadores de exposição e efeito, incluindo os bioquímicos, parâmetros imunológicos e genéticos.

De acordo com a atuação, os biomarcadores podem ser subdivididos em três classes (VAN DER OOST, 2003; DURIEUX, et al, 2011).

Biomarcadores de exposição ou de dose interna: abrangem a detecção e quantificação de um xenobiótico, seu(s) metabólito(s) ou o(s) produto(s) de interações entre este agente e moléculas e células-alvo, em um compartimento dentro de um organismo.

Biomarcadores de Efeito: qualquer alteração mensurável em nível bioquímico, fisiológico ou comportamental, dentro de tecidos ou fluidos corporais de um organismo, que possa estar associada com um problema de saúde ou doença, já estabelecido ou com potencialidade de ocorrer.

Biomarcadores de suscetibilidade: indicam a habilidade inerente ou adquirida de um organismo para responder à exposição a uma substância xenobiótica específica. Neste conjunto incluem-se fatores genéticos e mudanças em receptores, os quais alteram a suscetibilidade de um organismo àquela exposição.

A caracterização de respostas biológicas aos inúmeros poluentes em espécies capazes de indicar os primeiros sinais de estresse ambiental causado por contaminantes em diferentes níveis de organização biológica (bioindicadores) se tornou uma questão importante na avaliação de riscos e conseqüentemente no monitoramento ambiental. Entre as numerosas respostas biológicas, aquelas baseadas em variações no nível celular e molecular representam os primeiros sinais de perturbação ambiental e têm sido aplicadas em múltiplos estudos (BOMBAIL et al., 2001).

Cajaraville et al, (2000) entendem que em geral, nenhum biomarcador pode dar um diagnóstico completo dos efeitos da poluição em ambientes aquáticos e, por isso, um conjunto de biomarcadores deve ser usado, junto com outras medidas químicas e biológicas. De acordo com Oliveira Ribeiro et al (2002), o uso conjunto

de diferentes tipos de biomarcadores constitui uma valiosa estratégia no estudo do impacto de contaminantes sobre os sistemas naturais.

Avaliando que biomarcadores utilizados de forma individual possam não retratar de forma abrangente o comprometimento das condições de saúde do organismo, recomenda-se a utilização de um conjunto de biomarcadores para se avaliar o impacto dos poluentes químicos. Assim sendo, o uso de vários biomarcadores torna-se importante para minimizar a má interpretação em casos de situações complexas de poluição (FLAMMARIONet al., 2002).

3.4.1 Atividade das colinesterases (ChEs)

As colinesterases são enzimas de grande interesse e aplicação como biomarcadores. Segundo Rodriguez-Fuentes e Gold-Bouchot, (2000), ChEs têm sido os mais utilizados biomarcadores para avaliar a exposição e efeitos de diversos pesticidas organofosforados e carbamatos.

Colinesterases (ChEs) pertencem à família das enzimas denominadas esterases, com a capacidade de hidrolisar ésteres carboxílicos. Existem dois tipos dessas enzimas, acetilcolinesterase (AChE; EC 3.1.1.7) também conhecida como verdadeira ou colinesterase específica e butirilcolinesterase (BChE; EC 3.1.1.8), a qual é conhecida como esterase não específica ou pseudocolinesterase. Ambas são evolutivamente relacionadas, mas cada uma tem características particulares (SALLES, 2006) e que diferem na sua especificidade pelo substrato (ALPUCHE-GUAL e GOLD-BOUCHOT, 2008).

ChE pode ser distinguida de outras esterases, uma vez que elas têm preferência a exposição pela hidrólise de ésteres de colina, em vez de outros ésteres carboxílicos e são inibidas pela fisostigmina (eserina) em concentrações na ordem de 10^{-5} M (CASTROet al, 2009).

Biomarcadores bioquímicos como inibição de colinesterase são muitas vezes utilizados em avaliações ambientais de contaminação por pesticidas (VAN DER OOST,2003). Eles indicam a exposição ambiental a contaminantes antes dos efeitos no organismo ou níveis mais elevados de organização biológica são manifestadas (HANSON, 2009).

A enzima AChE tem um importante papel fisiológico nos mecanismos de controle do sistema nervoso. No sistema nervoso, os impulsos nervosos são

transmitidos através de células nervosas denominadas neurônios. O contato entre neurônios, assim como entre os neurônios e as células musculares ou células glandulares, são chamados de sinapses. Os impulsos nervosos se comunicam através da maioria das sinapses mediante transmissores químicos que são pequenas moléculas difusíveis, como a acetilcolina (ACh) e a noradrenalina. A acetilcolina é também um transmissor nos terminais das placas motoras, que são uniões entre o nervo e o músculo estriado (STRYER,1990). Quando a atividade de acetilcolinesterase diminui, a acetilcolina (ACh) não é quebrada e acumula no interior das sinapses que, portanto não podem funcionar em modo normal (DUTTA e ARENDS, 2003).

A AChE é a enzima responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina, formando colina e ácido acético. Tendo em vista que organofosforados e carbamatos possuem tempo de meia-vida curto, a análise da inibição da AChE é uma ferramenta útil para avaliar seu efeito na biota aquática, mesmo quando os compostos químicos não são mais detectáveis no ambiente (VALBONESI; SARTOR; FABBRI, 2003).

Os peixes apresentam as enzimas acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE). Van der Oost et al, (2003) cientificam que em peixes encontram-se ambas enzimas no tecido muscular, enquanto que no cérebro encontra-se somente AChE.

Cajaraville et al (2000) afirmam que entre os biomarcadores, a quantificação da atividade de acetilcolinesterase é considerada de grande interesse na avaliação dos efeitos de exposição para compostos neurotóxicos em animais aquáticos.

A atividade da acetilcolinesterase é frequentemente usada como biomarcador de toxicidade de inseticidas e herbicidas e é extremamente importante para muitas funções fisiológicas, tais como localização da presa; evasão do predador e orientação em relação ao alimento (MIRON et al, 2005).

Sturm et al, (1999) consideram a atividade da enzima colinesterase (ChE) um biomarcador capaz de indicar a presença de organofosforados e carbamatos.

3.4.2 Teste do micronúcleo

Outro biomarcador amplamente utilizado em estudos de biomonitoramento realizados para determinar o risco genético associado à exposição de pesticidas é o

micronúcleo (MN) (BOLOGNESI, et al, 2001). Trata-se de um método simples, confiável, sensível e de baixo custo para analisar impacto biológico de ambientes aquáticos poluídos (RUSSO et al., 2004).

O teste do micronúcleo foi originalmente desenvolvido por Schmid (1975) para células da medula óssea de camundongos e foi adaptado por Hooftman e De Raat (1982) para o estudo de células sanguíneas de peixes mantidos em laboratório. Essa modificação originou o que hoje conhecemos por Teste do Micronúcleo Písceo (CARRASCO; TILBURY; MYERS, 1990).

Outras adaptações metodológicas foram feitas no sentido de se utilizar o método em diversos organismos teste. Podemos destacar alguns organismos teste na avaliação da presença do micronúcleo, tais como: moluscos (BRESLER et al, 1999); girinos (*H. pulchella*) (LAJMANOVICH et al.,2005); cordão umbilical humano (LEVARIO-CARRILLO et al.,2005) e células de brânquias de peixes (ÇAVAS e ERGENE-GÖZÜKARA, 2005).

Micronúcleos são cromossomos inteiros ou parciais que não foram incorporados dentro do núcleo da célula filha durante a divisão celular e que aparecem como uma pequena estrutura arredondada e escura, idêntico em aparência ao núcleo celular. Do mesmo modo, podem ocorrer anomalias celulares, formadas quando determinada quantidade de material fica levemente atrasada na mitose fazendo com que o núcleo resultante não seja oval, mas apresente uma saliência de cromatina (BOMBAIL et al., 2001).

O micronúcleo origina-se da cromatina que, por razões diferentes, é retardada na anáfase. No curso da telófase este material é incluído em uma ou na outra célula filha, podendo permanecer fundido ao núcleo principal, ou ainda, formar um ou vários núcleos secundários. Como uma regra, micronúcleos são consideravelmente menores que o núcleo principal, por isto, é chamado de micronúcleo. O retardamento tem duas causas principais, a quebra de cromossomo e o mau funcionamento das fibras do fuso. No primeiro caso, os elementos retardatários são fragmentos cromossômicos acêntricos e, no segundo caso, eles consistem em cromossomos inteiros (SCHMID,1975; MA et al.,1995; GROVER e KAUR,1999). Portanto, os micronúcleos são formados no final da divisão celular, ao lado do núcleo principal (CHUNG et al.,2002).

Sabe-se que os ensaios de anormalidades nucleares e de micronúcleos têm sido largamente aplicados em peixes para a investigação dos efeitos mutagênicos

ambientais (HOSE et al., 1987; CARRASCO et al., 1990; VENTURA et al, 2008). O peixe é um modelo experimental adequado, para monitoramento aquático de genotoxinas, devido a sua habilidade em metabolizar xenobiótico e acumular contaminantes (MATSUMOTO et al., 2006).

Esse tipo de teste tem sido recomendado para estudos de biomonitoramento ambiental, principalmente por sua capacidade de detectar agentes clastogênicos (quebra de cromossomos), e de agentes aneugênicos (segregação cromossômica anormal) requerendo, no entanto, proliferação celular para a observação do biomarcador de efeito (FENECH, 2000; RIBEIRO et al., 2003).

O emprego do teste do micronúcleo apresenta várias vantagens, conforme a seguir:

- pode ser empregado tanto *in vivo* quanto *in vitro*, sendo que *in vivo* a atividade metabólica do animal é mantida, não ocorrendo o mesmo em um sistema teste *in vitro* (FORMIGLI et al., 2002);
- apresenta sensibilidade para medir atividade genotóxica em condições laboratoriais e no campo (GRISOLIA e STARLING, 2001);
- amostras de sangue periférico são apropriadas e suficientes para avaliações em projetos de biomonitoramentos, pois permite coleccionar várias amostras do mesmo indivíduo, sem que haja a necessidade de sacrificar o animal (PALHARES e GRISOLIA, 2002).

3.4.3 Ensaio Cometa

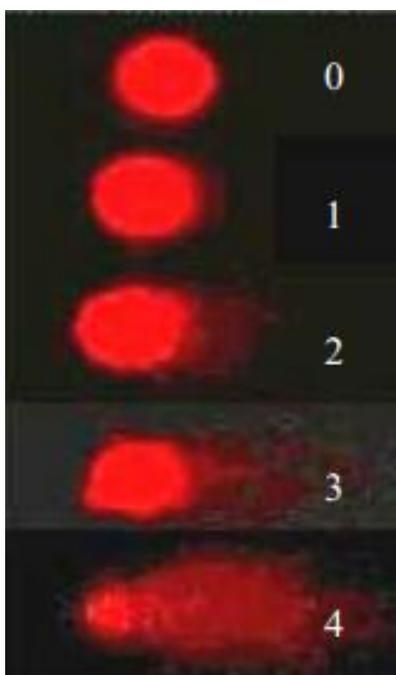
O Ensaio Cometa vem sendo cada vez mais utilizado como teste de genotoxicidade para o biomonitoramento de exposições ocupacionais e ambientais (MOLLER, 2006). Existe um crescente interesse no uso de bioindicadores para estudar efeitos de poluentes aquáticos em nível genômico. Os peixes teleósteos respondem a substâncias genotóxicas de modo similar a outros vertebrados, indicando a distribuição de contaminantes no ambiente e seus efeitos sobre os organismos (AL-SABTI E METCALFE, 2005).

Investigações científicas quanto à ação genotóxica ou clastogênica visam avaliar a extensão de danos genéticos à fita de DNA de células eucarióticas em consequência de exposições a agentes possivelmente genotóxicos. Esse tipo de dano pode ser mensurado por meio do ensaio cometa cujas siglas SCG (Single Cell

Gel) ou SCGE (Single Cell Gel Electrophoresis), identificam a técnica eletroforética em microgel, utilizada em análise biológica para a detecção e quantificação das quebras ou danos nas fitas de DNA em células individualizadas, que depois de coradas, os danos no DNA são visualizados ao microscópio (TICE et al., 2000; LIAO et al., 2009).

O princípio desta técnica se baseia no fato de que o DNA da célula que não tiver dano migrará em conjunto formando um círculo (os aspectos descritos só são visíveis após a coloração adequada). Caso ocorra dano ao DNA, serão formados fragmentos de diversos tamanhos. Os fragmentos menores tendem a migrar mais rapidamente do que os maiores. Ocorrendo um dano muito intenso em uma célula, muitos fragmentos de diversos tamanhos serão formados e migrarão em velocidades diferentes, formando-se então a figura típica de um cometa (OLIVE; BANÁTH; DURAND, 1990; COLLINS et al. 2008) (Figura 06).

Figura 6 - Classificação dos níveis de fragmentação do DNA segundo o grau de lesão.



Fonte: Rivero (2007).

Em estudos *in vivo*, o ensaio Cometa pode identificar efeitos genotóxicos em peixes teleósteos pela exposição a substâncias de diferentes classes e mecanismos de ação. Trata-se de um método rápido e relativamente barato para medir danos ao

DNA. Este ensaio tem encontrado muitas aplicações, particularmente em biomonitoramento e monitoramento ambiental (FRENZILLI et al, 2009).

O uso do Ensaio Cometa a eritrócitos de espécies de peixes teleósteos vem sendo realizado com sucesso, como em Lemos et al., (2005) para avaliação ambiental; Andrade et al (2004) em estudo *in vitro* para avaliação de potencial para biomonitoramento. Para DiPaolo (2006), estudos em peixes apresentam a vantagem de estes organismos possuírem eritrócitos tanto imaturos quanto maduros nucleados, havendo grande facilidade de obtenção de suspensão celular numerosa e de qualidade com a coleta de pequena quantidade de sangue, não sendo necessário causar danos adicionais evidentes aos indivíduos.

3.5 Biomonitoramento de Ambientes Aquáticos

Biomonitoramento consiste em observações repetidas de uma substância química ou mudança biológica, com um propósito definido de acordo com um planejamento prévio ao longo do tempo e espaço, utilizando métodos comparáveis e padronizados. Quando organismos vivos são usados no monitoramento ambiental para avaliar mudanças no meio ambiente ou na qualidade da água, o monitoramento é chamado de monitoramento biológico ou biomonitoramento (FIGUEIRA, 2006).

O monitoramento ambiental é uma importante ferramenta para a administração dos recursos naturais. Este oferece conhecimento e informações básicas para avaliar a presença de contaminantes, para compreender os sistemas ambientais e para dar suporte às políticas ambientais.

O monitoramento biológico é realizado principalmente através da aplicação de diferentes protocolos de avaliação, índices biológicos e multimétricos, tendo como base a utilização de bioindicadores de qualidade de água e habitat. Os principais métodos envolvidos abrangem o levantamento e avaliação de modificações na riqueza de espécies e índices de diversidade; abundância de organismos resistentes; perda de espécies sensíveis; medidas de produtividade primária e secundária; sensibilidade a concentrações de substâncias tóxicas (ensaios ecotoxicológicos), entre outros (BARBOUR et al., 1999). Desta forma, o monitoramento biológico constitui-se como uma ferramenta na avaliação das respostas de comunidades biológicas a modificações nas condições ambientais originais.

O monitoramento da presença de xenobióticos em ambientes aquáticos pode, a partir de estudos com espécies residentes, beneficiar a qualidade do ambiente, juntamente com a saúde humana. A localização e a determinação da concentração dos poluentes podem assegurar a vida destas espécies e também um ambiente saudável, garantindo ao ser humano sua utilização para alimentação, abastecimento e lazer (NICARETA, 2013).

De acordo com Benincá et al (2012), monitoramento biológico através de animais expostos à poluentes usando biomarcadores fornece uma ferramenta promissora para identificação de poluentes que podem causar danos à saúde humana e/ou a sustentabilidade dos ecossistemas.

No que diz respeito a organismos expostos a poluentes (bioindicadores), faz-se a necessidade do biomonitoramento utilizando testes em sistemas biológicos (biomarcadores), suscitando promissoras ferramentas para a identificação de poluentes capazes de causar dano à saúde humana e ao ambiente (DA SILVA, et al 2003).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Produtos Químicos

Os reagentes químicos utilizados foram: ácido 5,5 - Ditiobis-[2-nitrobenzóico] (DTNB), iodeto de acetiltiocolina (ATCh), iodeto de butiriltiocolina (BuTCh), albumina de soro bovino, fosfato de sódio, sulfato de eserina (fisostigmina), dimetilsulfóxido (DMSO), Coomassie Brilliant Blue G-250, ácido fosfórico 85%, etanol 95%, agarose padrão, agarose em baixo ponto de fusão (LMP), ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA) e glifosato ([N-(fosfonometil)glicina]) denominado roundup.

4.2 Área de Estudo

Os locais de amostragens, denominados de sítios 1 e 2, foram determinados de maneira a abranger pontos distintos, próximos aos projetos de irrigação com cultivos de coco, melancia, feijão, cebola, abóbora e manga localizados à margem do reservatório Itaparica, submédio São Francisco.

O sítio 1 tem sua área cultivada próxima a margem do rio e sua topografia apresenta inclinação que propicia maior possibilidade de recebimento de possíveis agroquímicos. O que não ocorre no sítio 2 que apresenta a área cultivada distanciada da margem.

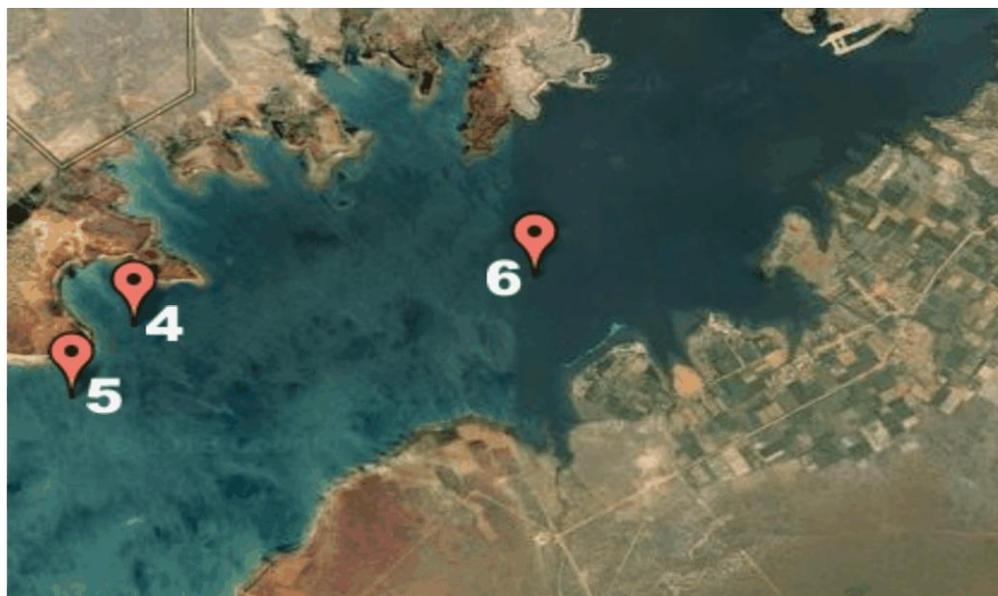
Em cada sítio de amostragem foram distribuídos três pontos. No sítio 1 foram demarcados: o ponto de coleta 1, próximo ao local do despejo (S 09°01'22,9" / W 038°15'01,6"), o ponto de coleta 2 com localização intermediária entre o ponto 1 e o 3 (S 09°01'18,0" / W 038°15'05,6") e o ponto de coleta 3 mais distante do local de despejo (S 09°01'16,0" / W 038°15'00,6"). Para o sítio 2, foram demarcados: o ponto 4 localizado próximo ao local do despejo (S 08°49'27,6" / W 038° 26'46"), ponto 5 com localização intermediária (S 08° 49' 20,9" / W 038° 24' 16,4") e o ponto 6 mais distante do local de despejo (S 08° 49' 49,8" / W 038° 27'02,0") (Figuras 07 e 08).

Figura 7 - Localização dos pontos de amostragens do sítio 1 situado no reservatório Itaparica – PE/BA.



FONTE: Google Earth

Figura 8 - Localização dos pontos de amostragens do sítio 2 situado no reservatório Itaparica – PE/BA.



FONTE: Google Earth

4.3 Espécies Escolhidas para Estudo

A escolha das espécies utilizadas no presente estudo levou em consideração informações obtidas com os pescadores da região, além de informações científicas como hábito alimentar e distribuição na coluna de água. Dentre as espécies escolhidas, uma delas seria utilizada como controle, sendo capturada no rio e em ambiente controlado.

Analisando essas informações, as espécies escolhidas foram: *Prochilodus brevis* (Steindachner, 1875) conhecida comumente como curimatã; *Astronotus ocelatus* (Agassiz, 1831), espécie exótica conhecida comumente como apaiari e *Serrasalmus brandtii* (Lutken, 1875), espécie nativa do rio São Francisco, conhecida comumente como pirambeba. A espécie escolhida como controle foi a curimatã pela disponibilidade de aquisição em ambiente controlado e livre de contaminantes. Esses espécimes foram gentilmente cedidos pela Estação de Piscicultura de Paulo Afonso (EPPA), vinculada a Companhia Hidro Elétrica do São Francisco (CHESF).

4.4 Amostras de Campo

As amostras foram coletadas bimensalmente durante o período de março/2012 a janeiro/2013 no reservatório Itaparica visando contemplar um período seco (março, setembro e novembro) e um período chuvoso (maio, julho e janeiro - trovoadas). O calendário das amostragens dos peixes foi baseado nas datas de lua nova por serem noites escuras, propiciando menor visibilidade das redes pelas espécies desejadas.

As redes foram colocadas na véspera da data da amostragem, dispostas nos pontos demarcados de acordo com as coordenadas geográficas recolhidas na manhã seguinte. Foram utilizados cerca de 500 a 700m de redes de espera, apresentando tamanhos diferentes de perímetro de malhas que variaram de 14 a 16 cm entre nós opostos, de acordo com o local e a espécie a ser capturada.

As amostragens realizadas nos meses de novembro/12 e janeiro/13 aconteceram sob autorização do Ministério do Meio Ambiente (MMA) / Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), sob número 36402-1 (ANEXO H) em função do período do defeso (piracema), quando a pesca enfrenta restrições para favorecer a reprodução das espécies.

Os parâmetros físico-químicos mensurados foram temperatura e oxigênio dissolvido. A leitura dos referidos parâmetros foi realizada nos pontos de coleta com auxílio do oxímetro (oxygen meter – modelo DO-5510).

Os dados pluviométricos de localidades circunvizinhas ao reservatório Itaparica que auxiliaram nas discussões deste trabalho, foram disponibilizados pelo Departamento de Recursos Hídricos e Estudos Energéticos da Companhia Hidro Elétrica do São Francisco (CHESF) conforme anexos.

4.4.1 Tratamento das amostras

Os exemplares foram capturados, mensurados os comprimentos totais (centímetro) e as massas medidas os pesos totais (grama). O número de exemplares capturados variou entre os meses de coleta e entre os sítios de amostragem. Imediatamente após essa etapa foi feita coleta do sangue para confecção de esfregaços em lâminas para realização do teste de micronúcleos e de anormalidades nucleares. Simultaneamente foi realizada a coleta de sangue para o ensaio do cometa, onde era colocado em eppendorf com anticoagulante, acondicionado em gelo e levado ao laboratório.

Os exemplares eram mantidos em gelo antes de serem decapitados. Era realizada decapitação para retirada dos cérebros que eram acondicionados em pequenos tubos plásticos devidamente etiquetados, congelados em nitrogênio líquido e transferidos para criogênio para serem estocados (Figura 09). O tecido muscular foi retirado da parte dorso lateral do peixe, envolvido em sachês de papel alumínio, devidamente etiquetados e também congelados em nitrogênio líquido. No laboratório foram mantidos em freezer a uma temperatura de -20°C .

Os procedimentos realizados com os exemplares de peixes das espécies estudadas foram feitos de acordo com os princípios éticos em experimentação animal, tendo aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas, protocolo nº 006258-2011-21 (ANEXO G).

Figura 9 - Extração do cérebro de pirambeba (*S. brandtii*).



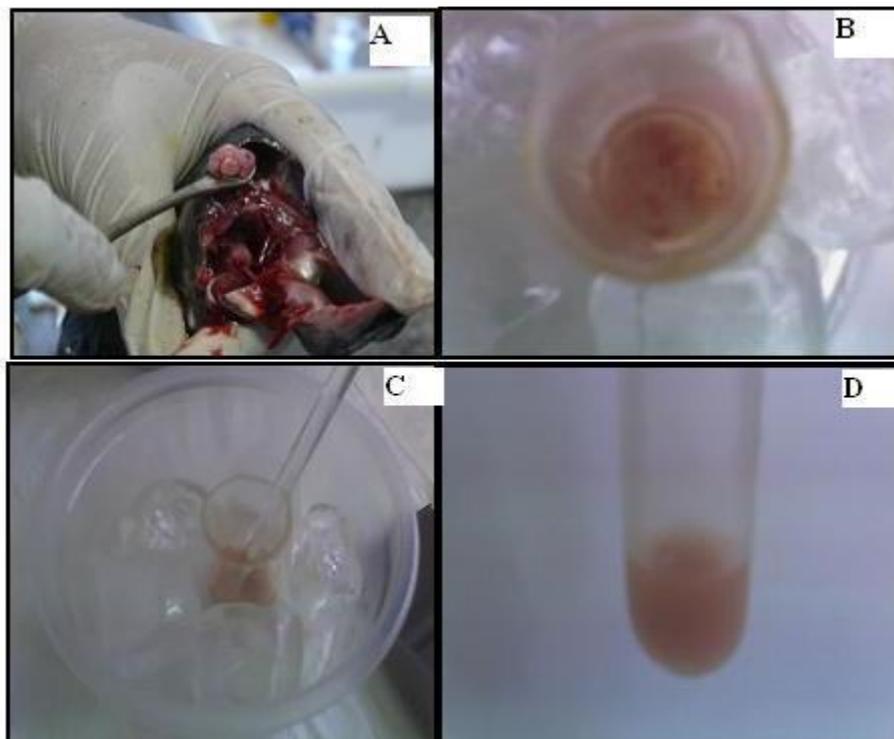
Fonte: Autora, 2014.

4.5 Preparação de Extratos dos Tecidos do Peixe

Os extratos de cérebro e músculo foram preparados separadamente. Para o preparo de extrato de cérebro, reuniram-se dois a três cérebros que foram medidas as massas e macerados sob banho de gelo em uma solução refrigerada de NaCl a 0,9% (v/v) (80 mg:1mL NaCl a 0,9%) e em seguida transferidos para homogeneizador de vidro Potter, parcialmente submerso em banho de gelo (Figura 10). A ruptura de células foi realizada em Ultrassom Fisher Scientific Sonic (5 ciclos de 15'' com intervalos de 15'') a uma frequência 22,5 KHz. Os intervalos foram em banho de gelo para resfriamento da haste metálica do ultrassom.

Para o preparo de extrato de músculo foi necessário homogeneizar o tecido inicialmente com almofariz e pistilo e em seguida com homogeneizador de vidro Potter-Elvehjem função de se tratar de um tecido fibroso. A ruptura de células também foi realizada em Ultrassom Fisher Scientific Sonic a uma frequência de 22,5 kHz (3 ciclos de 15'' com intervalos de 30''). A seguir, os extratos foram centrifugados a 4°C e 5000 g por 5 minutos em centrífuga refrigerada Sigma 3K30 (Osterode, Alemanha) e o sobrenadante coletado (extrato livre de células). As quantificações de proteínas e atividade enzimática foram feitas nos extratos recém-preparados em triplicata.

Figura 10 - Preparação do extrato (homogenato de células). A - Extração do cérebro; B - Pesagem dos cérebros; C - Maceração dos cérebros; D - Obtenção do extrato.



Fonte: SILVA, 2013.

4.6 Determinação de Atividade da Enzima ChE

A metodologia utilizada para o ensaio da atividade colinesterásica para cérebro e músculo de *S. brandtii* foi baseada no método de Ellman et al. (1961). Essas atividades foram quantificadas a um comprimento de onda de 412nm em espectrofotômetro UV/VIS (Perkin Elmer UV/VIS Lambda 2) usando acetiltiocolina (ATCh) e butiriltiocolina (BTCh) como substratos.

O ensaio foi realizado em uma mistura de reação contendo tampão fosfato de potássio ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) a 0,1 M e pH 8,0; solução 0,01 M de ácido 5,5- Ditiobis-[2-nitrobenzóico (DTNB), solução 0,075 M de iodeto de acetiltiocolina (ATCh) ou iodeto de butiriltiocolina (BTCh) como substratos para ChE e BChE, respectivamente e a diluição dos extratos de cérebro e músculo. Para a leitura do branco, foi adicionado água desmineralizada ao invés dos substratos ATCh ou BTCh. O tempo de reação foi de 5 minutos e todos os ensaios foram realizados em triplicata. O volume final utilizado foi de 3 mL.

A unidade da atividade colinesterásica (U) representa uma quantidade de enzima catalisando a hidroxilação de 1 μmol de substrato por minuto ($U = \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$).

A atividade da enzima foi calculada de acordo com:

$$U/\text{mL} = \frac{\Delta A/\Delta t}{\epsilon \cdot \ell} \times \frac{V}{V_e \cdot D}$$

Na qual: **V** é o volume total da mistura de reação na cuveta, $\Delta A/\Delta t$ é a velocidade de reação (variação de absorbância em função do tempo), ϵ é o coeficiente de extinção do ácido 5,5-ditio-bis-aminobenzóico (DTNB) em 412nm ($14,15 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), ℓ é o comprimento do percurso da cuveta (1cm), **V_e** representa o volume do extrato da enzima e **D** é o fator de diluição.

As atividades específicas foram expressas em mol de substrato. $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de teor de proteína.

4.7 Quantificação de Proteína

A quantificação de proteína foi determinada segundo método de Bradford et al.(1976). Para a preparação do reagente de Bradford, dissolveu-se 102,4 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 em 50 mL de etanol 95%. A solução foi agitada durante 60 minutos e, em seguida, adicionou-se 100mL de ácido fosfórico 85%. A solução assim obtida foi avolumada para 1 L com água desionizada e agitada por 10 minutos. Após filtração em papel de filtro, o reagente foi armazenado em ambiente escuro e seu recipiente coberto com papel alumínio. Todas as dosagens de proteína foram realizadas em triplicatas. O conteúdo protéico do extrato foi expresso em $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$.

A curva de calibração de proteínas foi construída empregando-se albumina de soro bovino como padrão. A leitura das absorbâncias foi realizada a 595 nm determinadas em espectrofotômetro (Perkin Elmer UV/VIS Lambda 2), utilizando-se água em lugar de solução-padrão para o branco.

4.8 Caracterização de AChE

4.8.1 Inibição de AChE

Para os ensaios inibitórios de AChE em cérebro de *S. brandtii*, foram utilizados os inibidores carbamato de eserina (fisostigmina) e o herbicida glifosato ([N-(fosfonometil)glicina]). Esse último foi escolhido em função de informações obtidas através dos pescadores nos locais de amostragem que dentre vários agroquímicos utilizados, o glifosato foi comum aos dois sítios. Para os ensaios inibitórios de AChE em músculo de pirambeba, utilizou-se o carbamato de eserina.

Nos ensaios inibitórios foram empregadas duas faixas de concentrações de eserina: de 0,015 a 2,0 μM para os extratos de cérebro e de 0,015 a 2,5 μM para os extratos de músculo. Para o ensaio inibitório com o glifosato, a faixa de concentração utilizada foi de 0,15 à 10 μM . Todos os ensaios foram testados em triplicata.

4.8.2 Parâmetros cinéticos

Os efeitos das concentrações do substrato na atividade enzimática de AChE de cérebro de pirambeba foram quantificados usando concentrações de iodeto de acetiltiocolina (ATCh) em um intervalo de concentração de substrato 0,005 a 1,25mM. Os ensaios da atividade da AChE foram feitos como descrito anteriormente utilizando o homogeneizado de células do cérebro (OLIVEIRA et al. 2007). As medições foram efetuadas em triplicata.

As constantes aparentes de Michaelis-Menten foram determinadas com um ajuste de curva de regressão não linear mostrando a variação na velocidade inicial para as concentrações de substrato. Utilizou-se a equação de Michaelis-Menten do programa GraphPadPrism 6 (GraphPad Software, Inc.).

Para comparar a eficiência da ChE presente nos extratos livres de células do cérebro da espécie estudada em relação acetiltiocolina, foi expressa em termos de $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína (DE LA TORRE et al, 2002).

4.9 Teste do Micronúcleo (MN)

O teste do micronúcleo em peixes é similar ao teste em mamíferos (SCHMID,1975) e foi adaptado para as características do organismo-teste baseado em protocolos descritos em outros experimentos realizados com peixes (GRISOLIA et al, 2005).

O teste do micronúcleo foi realizado através do sangue periférico coletado no local de amostragem (margem do rio) com seringas descartáveis de 5mL, sem uso de anestésicos seguindo a metodologia utilizada segundo Nepomuceno (1993). Essa metodologia consistiu em fazer uma punção na região branquial dos espécimes, rica em vasos sanguíneos, onde se obteve gotas de sangue necessárias para a confecção do esfregaço sanguíneo. Eram preparadas três lâminas para cada peixe. As lâminas eram secas ao ar livre durante aproximadamente 30 minutos, em seguida foram fixadas em metanol durante 15 minutos e coradas com solução de Giemsa 5% durante 40 a 50 minutos. Todas as lâminas foram devidamente identificadas e codificadas.

Foram examinados 1.000 eritrócitos por lâmina, totalizando 3.000 células de eritrócitos analisadas por peixe. Para detecção de micronúcleos nos eritrócitos, as lâminas foram analisadas utilizando um microscópio Labomed com aumento de 400 vezes com óleo de imersão para melhor visualização. Os micronúcleos foram identificados por corpos ovóides de cromatina circular apresentando a mesma coloração que o núcleo da célula.

A frequência de MN obtida em cada espécime foi comparada entre os dois sítios estudados e entre os meses de amostragens e foi analisada estatisticamente pelo método de Tukey ($p < 0,05$). Essa frequência de MN foi calculada segundo Al-Sabti e Metcalfe (1995).

$$\% \text{ MN} = \frac{\text{número de células com micronúcleos}}{\text{número total de células contadas}}$$

4.10 Anormalidades nucleares

A ocorrência de anormalidades nucleares foi analisada de acordo com Carrasco et al. (1990) e Ventura (2008) nas mesmas lâminas preparadas para avaliação da genotoxicidade do teste de Micronúcleo, onde foram contadas células

com núcleos “bleebbed”, “lobed”, “notched” e “vacuolated” em 1000 células de cada indivíduo.

Para a detecção das anormalidades, as lâminas também foram analisadas através do microscópio Labomed com aumento de 400 vezes.

Para as anormalidades nucleares, Carrasco, Tylbury e Myers (1990) descreveram as alterações morfológicas em núcleos de eritrócitos de peixes, classificadas como:

Bleebbed: Núcleos com uma pequena evaginação da membrana nuclear, parecendo conter eucromatina ou heterocromatina (mais escuro). O tamanho destas evaginações varia desde pequenas protuberâncias a estruturas completamente circunscritas.

Lobbed: Núcleos com evaginações mais largas do que as descritas para os bleebbed. Sua estrutura não é tão definida como a anterior. Alguns apresentam várias destas estruturas.

Vacuolated: Núcleos apresentam uma região que lembra vacúolos em seu interior. Estes “vacúolos” apresentam-se destituídos de qualquer material visível no seu interior.

Notched: Núcleos que apresentam um corte bem definido em sua forma. Geralmente com uma profundidade apreciável no núcleo. Estes cortes parecem não possuir material nuclear algum, e são delimitados por membrana celular.

4.11 Ensaio Cometa

O ensaio Cometa (Eletroforese em Gel de Célula Única) foi realizado em condições alcalinas de acordo com as diretrizes propostas por Singh et al (1988) e Tice et al (2000), com adaptações. O ensaio Cometa foi aplicado ao estudo do potencial genotóxico em exposição a eritrócitos de *S. brandtii*.

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 e 40µL foram colocados em duplicata. As lâminas foram cobertas com lamínulas e refrigeradas durante 5 minutos em gelo em gel.

Outros 40µL de agarose de baixo ponto de fusão (lowmelting point agarose - LMP) foram adicionados e repetidos os mesmos procedimentos anteriores nas

mesmas condições. Isto foi seguido por imersão em solução gelada de lise alcalina (2,5 M NaCl, 10 mM Tris, 100 mM Etilendiaminotetra-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 eletroforese (0,3 M de NaOH, 1 mM EDTA, pH 13), seguido por eletroforese a 25 V: 300 mA (1,25 V/cm) durante 20 min. Após a eletroforese, as lâminas foram então neutralizadas (0,4 M de Tris, pH 7,5) e coradas com corante fluorescente SYBER Green (Invitrogen™) diluído em PBS (1:200) durante 10 min.

A análise das lâminas envolveu 100 células por animal, utilizando a classificação visual baseada na migração de fragmentos de DNA do núcleo da classe 0 (ausência de danos), classe 1 (danos leves - inferior ou igual ao diâmetro de um núcleo), classe 2 (danos moderados - de um núcleo e inferior ou igual ao diâmetro maior que o diâmetro de dois núcleos) e classe 3 (danos severos - superior a duas vezes o diâmetro de um núcleo) (COLLINS et al, 2008).

A contagem das células foi efetuada em teste cego para obter o percentual de escores em microscópio de fluorescência (Olympus BX41 – aumento de 400X).

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 classe 1, 2 e 3, e dividindo-se pelo número total de células analisadas em cada tratamento. 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 índice de dano (unidade arbitrária) pode variar de 0 - 100 células ausentes de danos até 300, tendo todas as células com danos classe 3. A classificação dos níveis de fragmentação foi feita de acordo com Collins et al., 2008.

Foram utilizados dois índices da análise visual: Índice de Danos e Freqüência de Danos conforme descritos por Andrade et al.(2004). O Índice de Danos (ID) foi calculado como o total do produto da multiplicação entre o número de cometas de cada classe e o dígito denominador da classe (0,1,2 e3):

$$ID_{total} = 0.(n_{Classe0})+1.(n_{Classe1})+2.(n_{Classe2})+3.(n_{Classe3})$$

A Freqüência de Danos foi calculada como a porcentagem de todos os cometas danificados (classe1 à classe3) em relação ao total de cometas contados (n total).

$$Freqüência\ de\ danos = [(n\ total - n\ Classe0).100]/N\ total$$

4.12 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5% de probabilidade e expressos em média \pm desvio padrão.

A concentração inibitória (IC_{50}) foi calculada a partir da concentração do inibidor vs percentual de inibição da atividade da AChE, utilizando GraphPad Prism versão 6 para Windows (GraphPad Software) e o software XLSTAT for windows.

O efeito dos tratamentos nas diferentes células em relação à intensidade e frequência da formação de cometas e micronúcleos foram analisados utilizando a análise de variância, com nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados apresentados a seguir serão da espécie *S.brandtii* (pirambeba) que foi capturada durante todo o período amostral e conseqüentemente denota ocorrência freqüentede exemplares, pela facilidade de captura e por se tratar de uma espécie nativa do rio São Francisco que até o presente momento não foi estudada como bioindicadora, como detalhado anteriormente.

Os resultados obtidos das espécies *P. brevis* e *A. ocellatus* nos meses de coleta em que foram capturadas, estão disponíveis no APÊNDICE 1.

As Figuras 11 e 12 mostram um panorama dos sítios de amostragens no mês de janeiro/13. Áreas emersas exibindo grandes faixas de terra, como também uma edificação e troncos totalmente expostos em função do baixo nível da água alcançado no reservatório. Situação similar foi observada no mês novembro/12. Acontecimento que não ocorreu nos demais meses de amostragens (março a setembro/12).

Figura 11 - Panorama do baixo nível de água do reservatório Itaparica em jan/13 no sítio de amostragem 1.



Fonte: Autora, 2014.

Figura 12 - Panorama do baixo nível de água do reservatório Itaparica em jan/13 no sítio de amostragem 2.



Fonte: Autora, 2014.

5.1 Parâmetros Físico-Químicos e Morfológicos

Ambientes aquáticos são caracterizados pela variação de parâmetros físico-químicos da água como pH, temperatura, alcalinidade e demanda de oxigênio, os quais podem alterar o bioavaliação e subsequente toxicidade dos poluentes (MONSERRAT et al., 2007).

Os parâmetros abióticos, temperatura e oxigênio dissolvido são importantes fatores quando se trata de um estudo de monitoramento ambiental, pois estes podem exercer influência tanto para as respostas fisiológicas dos animais, como para os processos químicos que ocorrem com os contaminantes no ambiente, favorecendo ou não a biodisponibilidade dos contaminantes (GALLI et.al, 2001).

Os resultados dos parâmetros físico-químicos oxigênio dissolvido e temperatura mensurados nos sítios de amostragem estão mostrados nas Figuras 13 e 14.

Não foram detectadas diferenças expressivas de temperatura e oxigênio dissolvido ao longo dos meses estudados. O mes de novembro/12 apresentou as menores concentrações de oxigênio dissolvido (Figura 13). Nesse mesmo período foram evidenciados os mais baixos níveis de água nos sítios de coleta durante o período amostrado, deixando um recuo entre a margem do reservatório e a linha d'água alcançada conforme mostrado anteriormente. Conforme observado, as maiores temperaturas foram obtidas no mes de novembro/12 (Figura 14). Dentre

outros fatores que poderiam interferir (aumento de matéria orgânica, proliferação de microorganismos), uma provável causa que levou a esse comportamento foi por se tratar de um repressamento em menores volumes de água que recebeu maior incidência da radiação solar. Vale salientar que não houve captura no sítio 1 em janeiro/13, sendo obtidos resultados de oxigênio dissolvido e temperatura apenas no sítio 2.

Vieira et al (2014) em estudo desenvolvido em áreas agrícolas no riacho Água das Araras (PR) com a espécie de peixe *Astyanax altiparanae*, também não encontraram variação na temperatura e oxigênio dissolvido durante o período coletado.

Figura 13 - Oxigênio dissolvido (mg/L) (média e desvio padrão) mensurado nos sítios de amostragem localizados no reservatório Itaparica- PE/BA no período de mar/12 a jan/13.

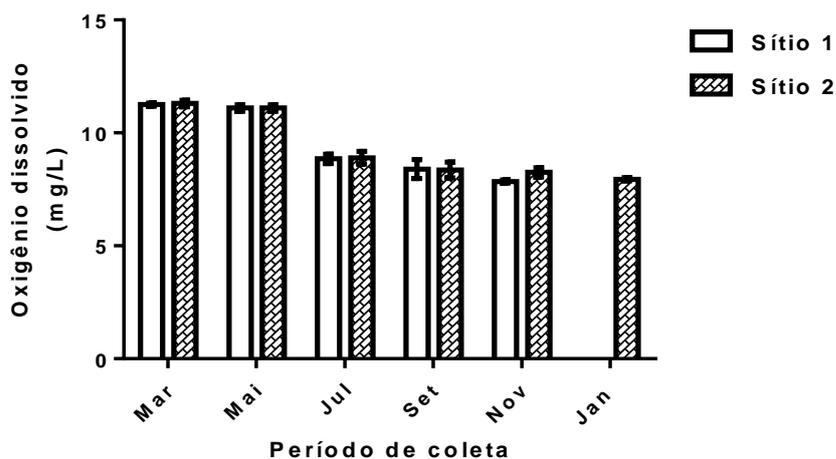
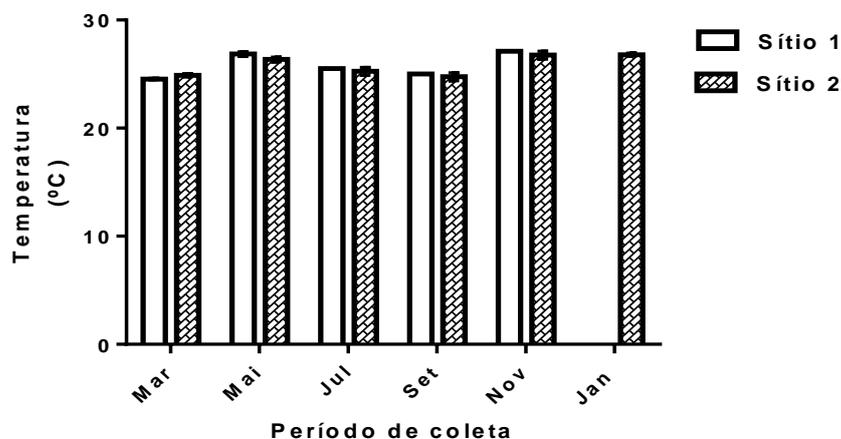


Figura 14 - Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) (média e desvio padrão) mensurado nos sítios de amostragem localizados no reservatório Itaparica- PE/BA no período de mar/12 a jan/13.



Os resultados dos parâmetros morfométricos massa e comprimento (média e desvio padrão) obtidos dos espécimes capturados bimensalmente nos sítios de amostragem estão apresentados nas Figuras 15 e 16, respectivamente.

Os menores valores de massa dos espécimes estudados nos dois sítios foram observados no mês de março/12 (395 g e 383 g, respectivamente) enquanto que os maiores valores foram obtidos no mês de julho/12 (578 g e 456 g, respectivamente) (Figura 15). Entretanto, os comprimentos mensurados nos espécimes estudados apresentaram seus valores bem próximos, conforme mostrado na Figura 16. No mês de maio/12, só houve captura de um espécime no sítio 1.

Figura 15 - Massas (média e desvio padrão) de exemplares de *S. brandtii* coletados no reservatório Itaparica-PE/BA no período de mar/12 a jan/13.

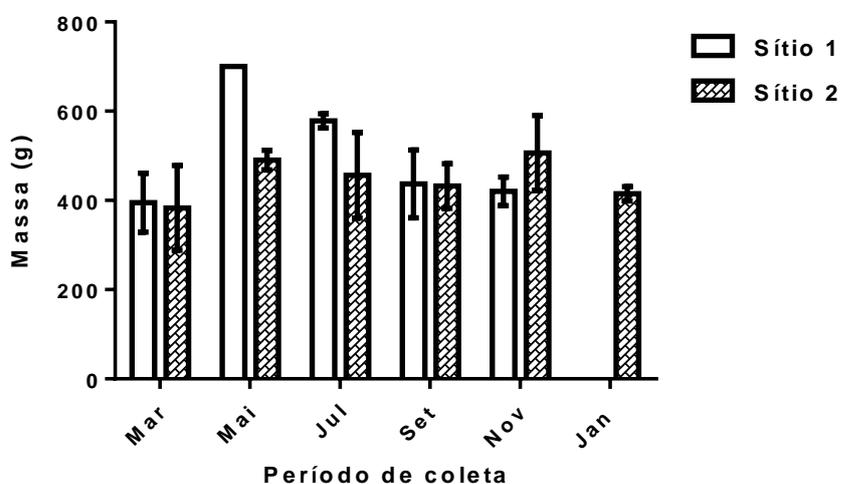
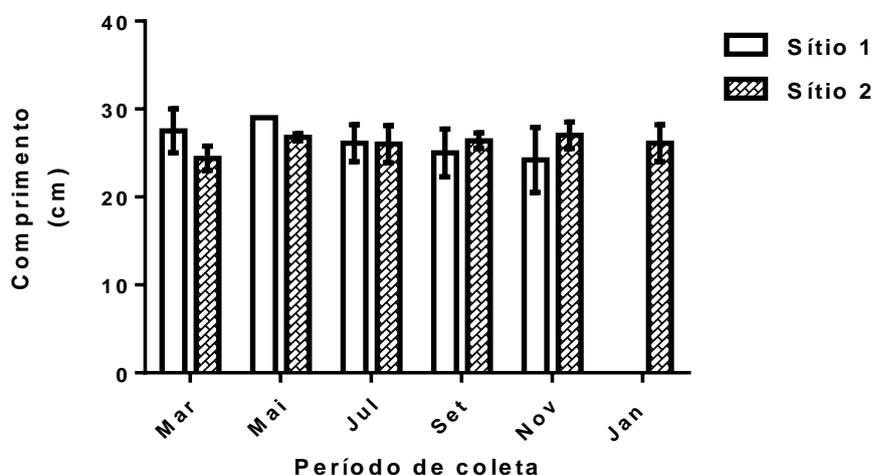


Figura 16 - Comprimentos (média e desvio padrão) de exemplares de *S. brandtii* coletados no reservatório Itaparica-PE/BA no período de mar/12 a jan/13.



5.2 Avaliações dos Biomarcadores

5.2.1 Avaliação da atividade das colinesterases

A atividade da colinesterase em peixes e outros organismos aquáticos tem sido utilizada como biomarcador de contaminação em peixes em programas de monitoramento por diferentes autores (RODRIGUEZ-FUENTES E GOLD-BOUCHOT, 2000; MONTEIRO et al., 2005; TORTELLI et al., 2006; DOMINGOS VALDEZ et al., 2007).

Com a finalidade de avaliar o perfil da atividade AChE e BChE em cérebro e músculo de *S. brandtii*, foram realizados no presente trabalho ensaios para determinação dessas atividades. As Tabelas 1 e 2 apresentam os resultados das atividades colinesterásicas obtidas dos cérebros dos espécimes de pirambema amostrados nos sítios 1 e 2, respectivamente.

No sítio 1 houve um decaimento significativo (cerca de 40%) entre os valores da atividade específica AChE no cérebro de pirambema coletada no mês de novembro/12 quando comparado com o resultado obtido no mês de março/12 (Tabela 1). O mesmo não ocorreu com o conteúdo protéico. A diferença estatística apresentada na atividade específica de AChE é exclusivamente advinda do decaimento da atividade de AChE que variou significativamente entre os meses de amostragem.

Os valores de atividade AChE cerebral obtidos nos meses de julho, setembro e novembro/12 foram significativamente menores quando comparados aos valores obtidos nos meses de março e maio/12.

Outros autores também obtiveram resultados de decaimento na atividade de AChE. Estudo realizado por Vieira et al (2014) com a espécie de peixe *Astyanax altiparanae* no riacho Água das Araras (PR) em ambiente caracterizado por atividade agrícola obtiveram redução significativa na atividade da AChE nos tecidos cerebral e muscular. Do mesmo modo, Matozzo et al, (2005) em trabalho de monitoramento realizado próximo a região portuária de Veneza (Itália) com molusco *Tapes philippinarum* obtiveram redução significativa na atividade AChE, indicando provável exposição a contaminantes originários da zona industrial do Porto Marghera.

Os resultados obtidos para atividade BChE e atividade específica BChE cerebral de pirambeba no sítio 1 de um modo geral não mostraram variação significativa e também não apresentaram um claro padrão de aumento ou decaimento ao longo do período estudado. Todavia, houve um decaimento significativo (cerca de 40%) entre o valor da atividade específica BChE no cérebro de pirambeba coletada no mes de março/12 ($0,007 \pm 0,001 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} / \text{mg P}$) quando comparado com o resultado obtido nos meses de julho e novembro/12 ($0,0180 \pm 0,002 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} / \text{mg P}$) (Tabela 1).

Tabela 1 - Atividades AChE e BChE em homogenato de células de cérebro de *S. brandtii* (pirambeba) coletadas no Sítio 1 no período de março/12 a novembro/12 localizado no reservatório Itaparica-PE/BA.

Período de coleta	Proteína (mg/mL)	Atividade AChE ($\mu\text{mol/mL}$)	A.EAChE ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}/\text{mg P.}$)	Atividade BChE ($\mu\text{mol/mL}$)	A.EBChE ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}/\text{mg P.}$)
Março	6,285 \pm 3,100 ^a	3,728 \pm 0,186 ^a	0,593 \pm 0,030 ^a	0,044 \pm 0,007 ^c	0,007 \pm 0,001 ^b
Maio	5,965 \pm 2,200 ^a	2,135 \pm 0,450 ^b	0,358 \pm 0,078 ^b	0,052 \pm 0,029 ^{bc}	0,009 \pm 0,020 ^b
Julho	4,065 \pm 0,704 ^a	1,314 \pm 0,061 ^c	0,323 \pm 0,010 ^{bc}	0,073 \pm 0,017 ^{ab}	0,018 \pm 0,002 ^a
Setembro	4,520 \pm 0,810 ^a	1,194 \pm 0,130 ^c	0,264 \pm 0,030 ^{bc}	0,051 \pm 0,011 ^{bc}	0,011 \pm 0,003 ^b
Novembro	4,795 \pm 0,300 ^a	1,134 \pm 0,079 ^c	0,236 \pm 0,020 ^c	0,084 \pm 0,010 ^a	0,018 \pm 0,002 ^a

A.E – Atividade específica; Prot. – Proteína. Letras diferentes na mesma coluna correspondem à diferença significativa pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$) observado.

Os valores obtidos de atividade AChE, atividade específica AChE cerebral e conteúdo protéico no sítio 2 também não diferiram significativamente (Tabela 2). Todavia, os valores de atividade BChE cerebral nos meses de março ($0,039 \pm 0,006$ $\mu\text{mol}/\text{mL}$) e julho/12 ($0,040 \pm 0,006$ $\mu\text{mol}/\text{mL}$) foram significativamente menores quando comparados com os valores obtidos em setembro/12 ($0,073 \pm 0,007$ $\mu\text{mol}/\text{mL}$) e janeiro/13 ($0,076 \pm 0,013$ $\mu\text{mol}/\text{mL}$) (Tabela 2).

Os valores de atividade AChE cerebral no sítio 1 foram estatisticamente semelhantes nos meses de julho, setembro e novembro/12, respectivamente ($1,314 \pm 0,061$; $1,194 \pm 0,130$ e $1,134 \pm 0,079$ $\mu\text{mol}/\text{mL}$). No entanto, houve diferença significativa nos valores de AChE cerebral entre os meses de março/12 e novembro/12, o que estaria provavelmente correlacionado com a baixa pluviosidade ocorrida em novembro/12 e conseqüentemente com a diminuição do volume de água do reservatório. Ressalva-se ainda que o sítio 1 apresenta em seu entorno áreas de cultivo mais próximas à margem do rio que o sítio 2, proporcionando possivelmente maiores possibilidades de recebimento de carga poluidora de agroquímicos.

A acetilcolinesterase apresenta uma ampla variação entre espécies de peixes de ecossistemas marinhos e dulciaquícolas. Oliveira et al., (2007) trabalhando com peixes marinhos, verificaram valores de atividade AChE cerebral variando entre $0,145 \pm 0,039$ $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}/\text{mg P}$ para *Porichthys porosissimos* e $0,493 \pm 0,054$ $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}/\text{mg P}$ para *Paralichthys patagonicus*. Para peixes de água doce, De la Torre et al., (2007) apresentaram atividade de AChE cerebral em *Cnesterodondecem maculatus* variando entre $0,211 \pm 0,011$ à $0,273 \pm 0,014$ $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}/\text{mg P}$.

No presente trabalho, observou-se que os maiores valores de atividade ($3,728 \pm 0,186$ $\mu\text{mol}/\text{mL}$) e atividade específica AChE cerebral ($0,593 \pm 0,030$ $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}/\text{mg P}$) obtidos no sítio 1 foram apresentados no mês de março/12 (Tabela 1). Foi observado também que o mês de março foi marcado por apresentar maior volume pluviométrico (APÊNDICE B e C) dentre o período de amostragem, possivelmente ocasionando diluição da carga poluidora de agroquímicos naquele local (sítio 1).

Tabela 2 - Atividades AChE e BChE em homogenato de células de cérebro de *S. brandtii* (pirambeba) coletadas no Sítio 2 no período de mar/12 a jan/13 localizado no reservatório Itaparica - PE/BA.

Período de coleta	Proteína (mg/mL)	Atividade AChE ($\mu\text{mol/mL}$)	A.E AChE ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}/\text{mg P}$)	Atividade BChE ($\mu\text{mol/mL}$)	A.E BChE ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}/\text{mg P}$)
Março	5,369 \pm 0,211 ^a	2,580 \pm 0,032 ^a	0,480 \pm 0,096 ^a	0,039 \pm 0,006 ^b	0,007 \pm 0,001 ^a
Maio	4,704 \pm 2,513 ^a	2,410 \pm 0,103 ^a	0,513 \pm 0,022 ^a	0,061 \pm 0,013 ^{ab}	0,013 \pm 0,001 ^a
Julho	4,950 \pm 4,700 ^a	2,060 \pm 0,203 ^a	0,416 \pm 0,145 ^a	0,040 \pm 0,006 ^b	0,008 \pm 0,003 ^a
Setembro	6,076 \pm 3,300 ^a	2,490 \pm 0,090 ^a	0,410 \pm 0,007 ^a	0,073 \pm 0,007 ^a	0,012 \pm 0,003 ^a
Novembro	5,360 \pm 1,475 ^a	2,500 \pm 0,080 ^a	0,467 \pm 0,113 ^a	0,061 \pm 0,009 ^{ab}	0,011 \pm 0,003 ^a
Janeiro	5,918 \pm 0,241 ^a	2,740 \pm 0,051 ^a	0,464 \pm 0,279 ^a	0,076 \pm 0,013 ^a	0,013 \pm 0,002 ^a

A.E – Atividade específica; Prot. – Proteína. Letras diferentes na mesma coluna correspondem à diferença significativa pelo Teste de Tukey (p<0,05).

Os resultados apresentados nas Tabelas 3 e 4 referem-se às atividades colinesterásicas do tecido muscular de *S. brandtii* amostrados nos sítios de 1 e 2.

Avaliando os resultados obtidos no sítio 1, foi observado um decaimento significativo (cerca de 40%) entre o valor de atividade AChE no músculo coletado no mês de setembro/12 quando comparado com o resultado obtido no mês de julho/12. Para atividade específica AChE muscular também foi mostrado decaimento significativo (30%) no mês de setembro/12 quando comparado com o resultado obtido no mês de julho/12 (Tabela 3). É possível inferir que essa inibição na atividade pode provavelmente estar relacionada com a pluviosidade.

No sítio 1, foi observado um aumento significativo (cerca de 25%) entre o valor de atividade BChE muscular de *S. brandtii* coletada no mês de março/12 quando comparado com o resultado obtido no mês de julho/12. Fazendo a mesma análise para a atividade específica de BChE muscular, observou-se também aumento significativo (cerca de 30%) entre o valor obtido no mês de março/12 comparado ao valor obtido no mês de julho/12. Presume-se ter ocorrido alguma outra influência local antes do mês de março/12 (início das coletas) que não com o volume da água (possivelmente uso mais intenso de agroquímico).

A Tabela 4 retrata os valores obtidos para a atividade e atividade específica de AChE e BChE, além do conteúdo protéico no tecido muscular dos espécimes de *S. brandtii* capturados no sítio 2.

Em análise realizada, observou-se um aumento significativo (cerca de 40%) no valor de atividade AChE muscular obtida no mês de novembro/12 quando comparado ao valor obtido no mês de setembro/12. Com relação à atividade específica AChE no músculo de pirambeba, houve um decaimento significativo (cerca de 60%) entre o valor obtido no mês de maio/12 quando comparado com o resultado obtido no mês de março/12.

Avaliando os resultados da BChE muscular, notou-se que a atividade BChE muscular de espécimes coletados no mês de setembro/12 apresentou aumento significativo (cerca de 40%) quando comparado ao resultado do mês de janeiro/13. O mesmo não ocorrendo com a atividade específica BChE muscular que apresentou aumento significativo (cerca de 40%) no mês de setembro/12 em comparação ao resultado obtido no mês de novembro/12.

Dados que relacionam a atividade da acetilcolinesterase em peixes com variações de temperatura são relatados na literatura. Nestes estudos, os autores atribuem a temperatura como fator responsável pelas diferenças sazonais observadas na atividade enzimática, apresentando, de forma geral, maiores valores de atividade enzimática nas estações mais quentes e vice-versa (BOCQUENÉ e GALGANI, 1990; KIRBY, et al, 2000). No presente trabalho, os resultados não evidenciaram correlação entre os parâmetros físico-químicos e a atividade colinesterásica nas áreas avaliadas. Também não foi apresentada relação entre os parâmetros morfométricos massa e comprimento com a atividade colinesterásica.

No presente trabalho não foi feita distinção de sexo entre os peixes em função do número de exemplares capturados não ter sido grande. Robinson et al (2010) em investigação da resposta de atividade de AChE em *Clarias gariepinus* expostos a organofosforados e carbamatos, mostraram que o nível basal da atividade AChE cerebral dessa espécie de peixe foi comparável entre espécimes machos e fêmeas. A ausência de diferenças entre os sexos observada em atividade de AChE, também foi um resultado semelhante aos relatados em diferentes espécies de peixes por Payne et al. (1996) (*Salmo trutta e Pleuronectes americanus*); Flammarion et al. 2002 (*Leuciscus chephalus*).

Tabela 3 - Atividades AChE e BChE em homogenato de células de músculo de *S. brandtii* (pirambeba) coletadas no Sítio 1 localizado no reservatório Itaparica - PE/BA.

Período de coleta	Proteína (mg/mL)	Atividade AChE ($\mu\text{mol/mL}$)	A.E AChE ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}/\text{mg P}$)	Atividade BChE ($\mu\text{mol/mL}$)	A.E BChE ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}/\text{mg P}$)
Março	3,340 \pm 0,262 ^b	0,200 \pm 0,003 ^{abc}	0,060 \pm 0,010 ^c	0,012 \pm 0,001 ^c	0,004 \pm 0,0002 ^c
Maio	4,780 \pm 0,125 ^a	0,325 \pm 0,131 ^{ab}	0,068 \pm 0,027 ^{ab}	0,047 \pm 0,014 ^{ab}	0,010 \pm 0,003 ^{ab}
Julho	3,730 \pm 0,285 ^b	0,372 \pm 0,056 ^a	0,100 \pm 0,015 ^a	0,049 \pm 0,004 ^a	0,013 \pm 0,001 ^a
Setembro	4,500 \pm 0,094 ^a	0,137 \pm 0,045 ^c	0,030 \pm 0,010 ^{bc}	0,033 \pm 0,01 ^{abc}	0,007 \pm 0,002 ^{bc}
Novembro	4,750 \pm 0,064 ^a	0,145 \pm 0,044 ^{bc}	0,031 \pm 0,009 ^{bc}	0,025 \pm 0,003 ^{bc}	0,005 \pm 0,001 ^{bc}

A.E – Atividade específica; Prot. – Proteína. Letras diferentes na mesma coluna correspondem à diferença significativa pelo Teste de Tukey (p<0,05) observado.

Tabela 4 - Atividades AChE e BChE em homogenato de células de músculo de *S. brandtii* (pirambeba) coletadas no Sítio 2 localizado no reservatório Itaparica - PE/BA.

Período de coleta	Proteína (mg/mL)	Atividade AChE ($\mu\text{mol/mL}$)	A.E AChE ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}/\text{mg P}$)	Atividade BChE ($\mu\text{mol/mL}$)	A.E BChE ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}/\text{mg P}$)
Março	4,075 \pm 0,515 ^f	0,278 \pm 0,041 ^{ab}	0,067 \pm 0,014 ^b	0,027 \pm 0,004 ^{ab}	0,007 \pm 0,001 ^{ab}
Maio	4,805 \pm 0,778 ^a	0,186 \pm 0,021 ^{bc}	0,041 \pm 0,002 ^a	0,040 \pm 0,005 ^{ab}	0,008 \pm 0,003 ^{ab}
Julho	4,130 \pm 0,500 ^e	0,175 \pm 0,030 ^{bc}	0,042 \pm 0,006 ^b	0,048 \pm 0,010 ^a	0,012 \pm 0,003 ^a
Setembro	4,310 \pm 0,100 ^c	0,127 \pm 0,022 ^c	0,030 \pm 0,004 ^{ab}	0,019 \pm 0,009 ^b	0,005 \pm 0,002 ^b
Novembro	4,160 \pm 1,521 ^d	0,311 \pm 0,033 ^a	0,075 \pm 0,058 ^{ab}	0,048 \pm 0,016 ^a	0,012 \pm 0,001 ^a
Janeiro	4,590 \pm 1.100 ^b	0,288 \pm 0,019 ^{ab}	0,063 \pm 0,041 ^{ab}	0,049 \pm 0,008 ^a	0,011 \pm 0,003 ^{ab}

A.E – Atividade específica; Prot. – Proteína. Letras diferentes na mesma coluna correspondem à diferença significativa pelo Teste de Tukey (p<0,05) observado.

Fazendo uma comparação entre os resultados obtidos nos sítios estudados, observou-se que no geral os espécimes de *S. brandtii* no sítio 1 obtiveram menores atividades de AChE cerebral, exceto no mês de março/12, cujo valor de AChE cerebral ($3,728 \pm 0,19 \mu\text{mol/mL}$) foi cerca de 27% maior que o maior valor obtido no sítio 2 ($2,740 \pm 0,05 \mu\text{mol/mL}$).

Outra diferença entre os sítios foi da atividade específica de AChE cerebral, cujo maior valor obtido no sítio 1 ($0,593 \pm 0,03 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}/\text{mg P}$) foi cerca de 14% superior ao maior valor do sítio 2 ($0,513 \pm 0,02 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}/\text{mg P}$).

No tocante a atividade de BChE cerebral dos espécimes estudados nos sítios de amostragem, verificou-se que o maior valor obtido no sítio 1 ($0,084 \pm 0,01 \mu\text{mol/mL}$) correspondeu a cerca de 10% mais que o valor obtido para o sítio 2 ($0,076 \pm 0,01 \mu\text{mol/mL}$). Percentualmente maior foi também a atividade específica de BChE cerebral observada no sítio 1 ($0,018 \pm 0,002 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}/\text{mg P}$), correspondendo cerca de 17% do maior valor apresentado para o sítio 2 ($0,013 \pm 0,01 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}/\text{mg prot.}$).

Com relação ao tecido muscular, o comportamento observado com a atividade específica de AChE apresentou seu maior valor obtido no sítio 1 ($0,100 \pm 0,02 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}/\text{mg prot}$) cerca de 25% a mais que o maior valor do sítio 2 ($0,075 \pm 0,02 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}/\text{mg prot}$). Assim também ocorreu com a atividade de AChE muscular, cujo o maior valor obtido no sítio 1 ($0,372 \pm 0,06 \mu\text{mol/mL}$) foi cerca de 17% maior que ($0,311 \pm 0,03 \mu\text{mol/mL}$), valor superior obtido no sítio 2 (Tabelas 3 e 4).

Em ambos os sítios, o menor valor de atividade da AChE muscular de *S. brandtii* ocorreu no mês de setembro/12 ($0,137 \pm 0,04 \mu\text{mol/mL}$ e $0,127 \pm 0,02 \mu\text{mol/mL}$, respectivamente) (Tabelas 3 e 4).

Monteiro et al., (2006), verificaram que a atividade de AChE na espécie *Brycon cephalus* em presença de acetilcolina como substrato específico indicou uma proporção maior de AChE no cérebro e uma menor no tecido muscular.

De acordo com Linde-Arias et al., (2008), também foi observado decaimento expressivo de cerca de 60% na atividade AChE cerebral da espécie *Oreochromis niloticus* coletada em local com intensa atividade agrícola no rio Paraíba do Sul (RJ) quando comparado com valores obtidos em local distante de área poluída. Os autores atribuem às baixas atividades obtidas ao efeito de pesticidas.

5.3 Caracterização da Atividade de AChE

5.3.1 Inibição de AChE

A caracterização da AChE cerebral e muscular foi determinada através de ensaios utilizando como inibidores carbamato de eserina (fisostigmina) e glifosato ([N-fosfonometil] glicina] denominado Roundup - herbicida mais comercializado no mundo (MARC et al, 2004), comum aos dois sítios de coleta. O valor da concentração inibitória de 50 % da atividade da AChE (IC₅₀) indica o nível de sensibilidade da espécie de peixe a inibidores da colinesterase.

A Tabela 5 mostra os valores do efeito inibitório do carbamato de eserina (fisostigmina) em AChE cerebral e muscular de *S. brandtii* que inibiu 50% das atividades de AChE. Também foi analisado o efeito inibitório do glifosato na AChE cerebral.

O valor da concentração inibitória de 50 % da atividade da AChE (IC₅₀) indica o nível de sensibilidade das diferentes espécies de peixes a inibidores da colinesterase. Para os valores de IC₅₀ apresentados na Tabela 5, observou-se que em *S. brandtii*, a AChE muscular (0,362±0,2 µM) foi mais sensível à eserina que a AChE cerebral (0,887±0,1 µM). Todavia, comparando-se a AChE cerebral entre a eserina (0,887±0,1 µM) e o glifosato (2,276±0,02 µM), verificou-se uma maior sensibilidade para a AChE cerebral com eserina.

Tabela 5 - Valores de IC₅₀ obtidos para AChE cerebral e muscular de *S. brandtii* com os inibidores carbamato de eserina (fisostigmina) e glifosato.

INIBIDOR	TECIDO	IC ₅₀ (µM)
Eserina	Cérebro	0,887±0,1
Glifosato	Cérebro	2,276±0,2
Eserina	Músculo	0,362±0,2

Outros trabalhos apresentaram diminuição no valor da atividade AChE cerebral quando expostos ao glifosato. Gluszcak et al (2005) verificaram seu efeito sobredeclínio da atividade da AChE no cérebro de *Leporinus obtusidens* expostos a diferentes concentrações quando comparado ao controle. Modesto e Martinez (2010) averiguaram diminuição significativa na atividade de AChE no cérebro de

Prochilodus lineatus após 96 horas de exposição quando expostos a diferentes concentrações de glifosato.

As Figuras 17 e 18 mostram as curvas de inibição de atividade AChE no tecido cerebral de espécimes de *S. brandtii* em diferentes concentrações testadas do substrato acetilcolina, usando como inibidores eserina (fisostigmina) e glifosato, respectivamente.

Na Figura 19 é mostrada a curva de inibição de atividade AChE no tecido muscular de espécimes de *S. brandtii* em diferentes concentrações testadas do substrato acetilcolina, usando como inibidor eserina (fisostigmina).

Relacionando-se valores de IC_{50} para o inibidor eserina obtidos para AChE cerebral de peixes segundo vários autores, observou-se que o IC_{50} de *S. brandtii* ($0,887 \mu\text{mol/L}$) encontra-se mais próximo ao IC_{50} da AChE da espécie *Cyprinus carpio* ($0,500 \mu\text{mol/L}$) (Tabela 8).

Figura 17 - Inibição de atividade AChE em cérebro de *S. brandtii* em diferentes concentrações de acetilcolina usando eserina como inibidor

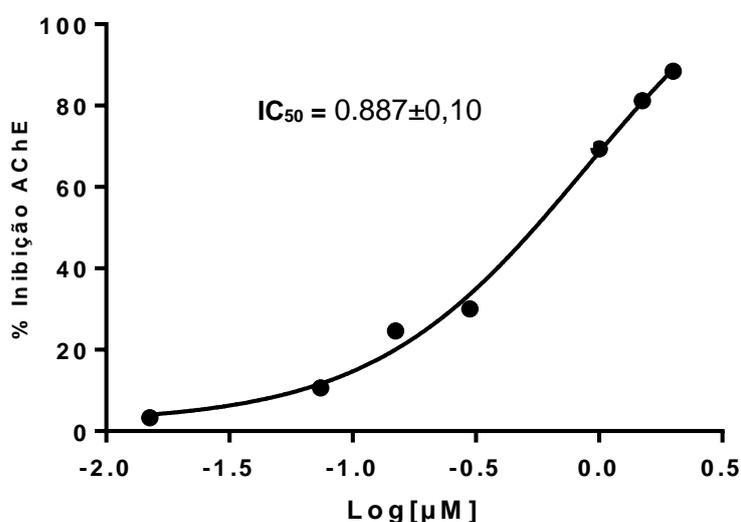


Figura 18 - Inibição de atividade AChE em cérebro de *S. brandtii* em diferentes concentrações de acetiltiocolina usando glifosato como inibidor.

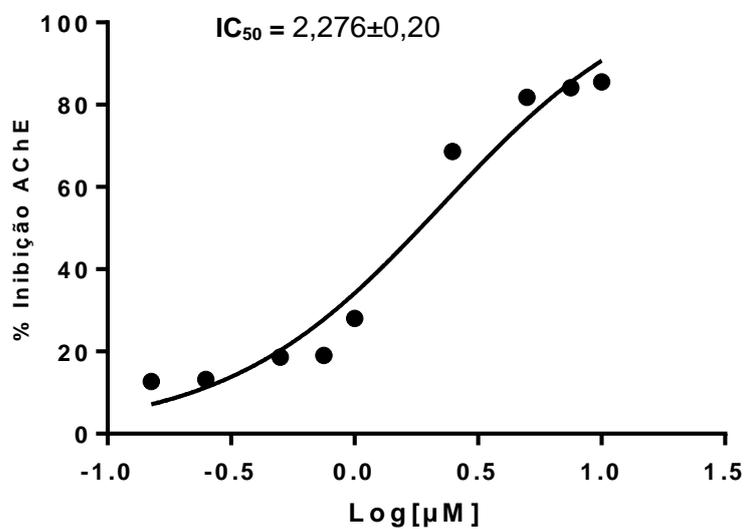
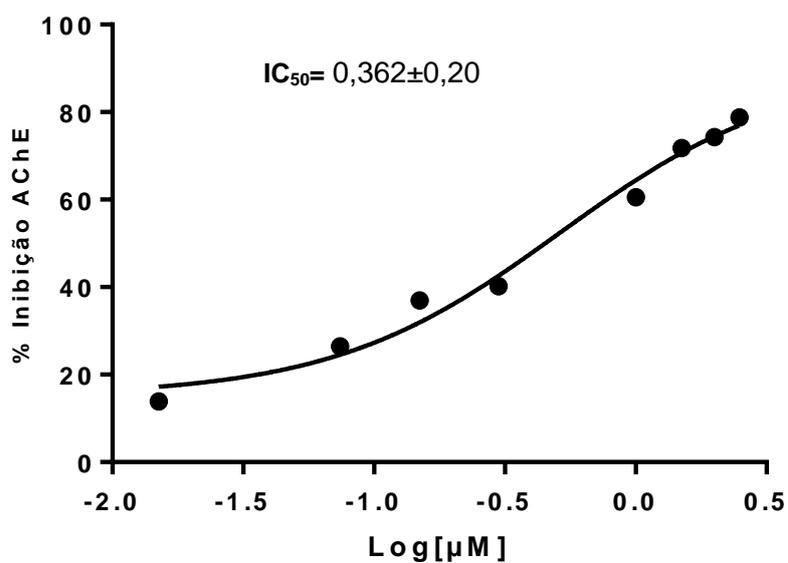


Figura 19 - Inibição de atividade AChE em músculo de *S. brandtii* em diferentes concentrações de acetiltiocolina usando eserina como inibidor.

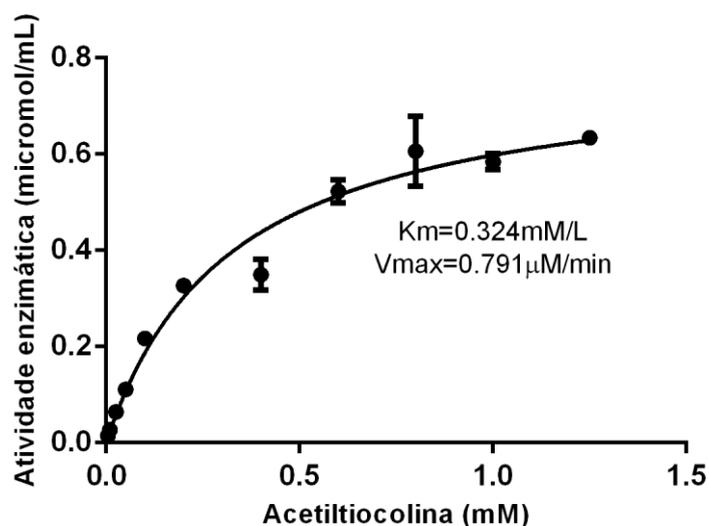


5.3.2 Parâmetros cinéticos

A constante aparente de Michaelis–Menten (K_m^{app}) e a velocidade máxima aparente de hidrólise do substrato ($V_{máx.}^{app}$) foram determinadas para iodeto de acetilcolina (ATCh).

O comportamento cinético de AChE cerebral de *S. brandtii* em presença de ATCh como substrato pode ser visto na Figura 20. A constante aparente de Michaelis-Menten (K_m^{app}) e a velocidade máxima ($V_{máx.}^{app}$) obtidas dos extratos de *S. brandtii* apresentaram valores de $0,324 \text{ mmol/L} \pm 0,04$ e $0,791 \text{ } \mu\text{mol/min} \pm 0,04$, respectivamente.

Figura 20 - Comportamento cinético de AChE cerebral de *S. brandtii* em presença de acetilcolina.



A constante de Michaelis-Menten (K_m) e a velocidade máxima ($V_{máx.}$) são constantes de extrema importância no estudo das reações enzimáticas. K_m nos fornece uma estimativa da afinidade química de uma enzima pelo seu substrato.

Os resultados de K_m^{app} e $V_{máx.}^{app}$ calculados para AChE cerebral foram comparados com os de outros autores e estão mostrados na Tabela 8.

Comparando-se a constante aparente de Michaelis–Menten (K_m^{app}) obtida no presente trabalho com resultados apresentados na Tabela 6, observou-se que a afinidade de AChE cerebral de *S. brandtii* ($0,324 \pm 0,04 \text{ mM/L}$) é comparável as afinidades de AChE cerebral de *Anguilla anguilla* ($0,310 \pm 0,04 \text{ mM/L}$) e *Haemulon*

plumieri ($0,310 \pm 0,16$ mM/L) para ATCh (VALBONESI et al., 2011; ALPUCHE-GUAL e GOLD-BOUCHOT, 2008), ambas espécies marinhas. Silva Filho et al.(2004) apresentaram para AChE cerebral das espécies de peixes de água doce *Piaractus mesopotamicus* ($3,10 \times 10^{-3}$ mM/L), *Prochilodus lineatus* ($1,23 \times 10^{-4}$ mM/L) e *Hypostomus punctatus* ($4,92 \times 10^{-4}$ mM/L) valores maiores que *S. brandtii*.

Tabela 6 - Comparação da constante aparente de Michaelis–Menten (Km), velocidade máxima (Vmax) e valores de IC₅₀ da acetilcolinesterase cerebral de pirambeba (*S. brandtii*) usando acetiltiocolina como substrato e eserina como inibidor.

Espécie	Km ^{app} (mmol/L)	Vmáx ^{app} (mmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹ proteína)	IC ₅₀ (µmol/L)	Referência
<i>Serrasalmus brandtii</i>	0,324±0,04	0,791±0,04	0,887	Presente trabalho
<i>Colossoma macropomum</i>	0,043±0,015	0,301±0,014	0,158	Silva, 2013
<i>Haemulon plumieri</i>	0,310±0,16	0,237±22,73	1,700	Alpuche-Gual e Gold-Bouchot, 2008
<i>Carassius auratus</i>	0,720±0,05	0,082±0,022	6,620	Liu et al., 2007
<i>Cyprinus carpio</i>	0,230	0,482	0,500	De la Torre et al., 2002
<i>Cnesterodon decemmaculatus</i>	0,170	0.464	1,430	De la Torre et al., 2002
<i>Anguilla anguilla</i>	0,310±0.04	0,040±1,23	0,004	Valbonesiet al., 2011
<i>Cathorops spixii</i>	0,196±0,078	0,021±5,00	0,077	Tortelliet al., 2006

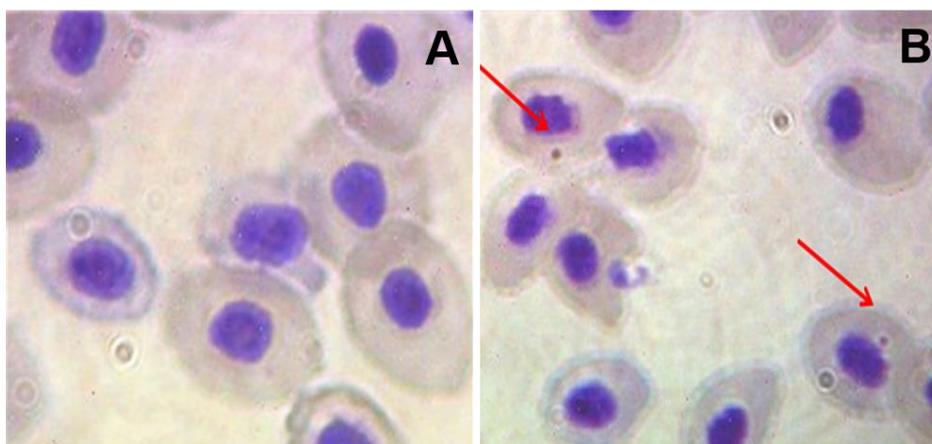
A razão $Vmáx^{app}/Km^{app}$ foi considerada como um indicador da eficiência catalítica. $Vmáx$ relaciona-se com o número de renovação enzimática ($Kcat$), que é equivalente ao número de moléculas de substrato que se convertem em produto em certa unidade de tempo, em uma única molécula de enzima quando ela for saturada com o substrato (Lehninger, 2006). No presente trabalho, foi utilizado extrato bruto e, portanto não foi possível quantificar $Kcat$ precisamente, por isso valores diferentes foram apresentados para $Vmáx$ na Tabela 6. Assim sendo, os resultados mostrados por Silva Filho et al.(2004) para as três enzimas apresentaram $Vmáx$ diferentes e conseqüentemente terão $Kcat$ diferentes.

5.3.3 Avaliação da genotoxicidade através do teste do micronúcleo (MN) e anormalidades nucleares (AN).

5.3.3.1 Teste do micronúcleo (MN)

A formação de micronúcleos é uma resposta de curto prazo a uma substância genotóxica, de modo a que a sua expressão depende da intensidade de exposição a contaminantes e provavelmente independentes da duração de tal exposição (HEDDLE et al., 2009) (Figura 21).

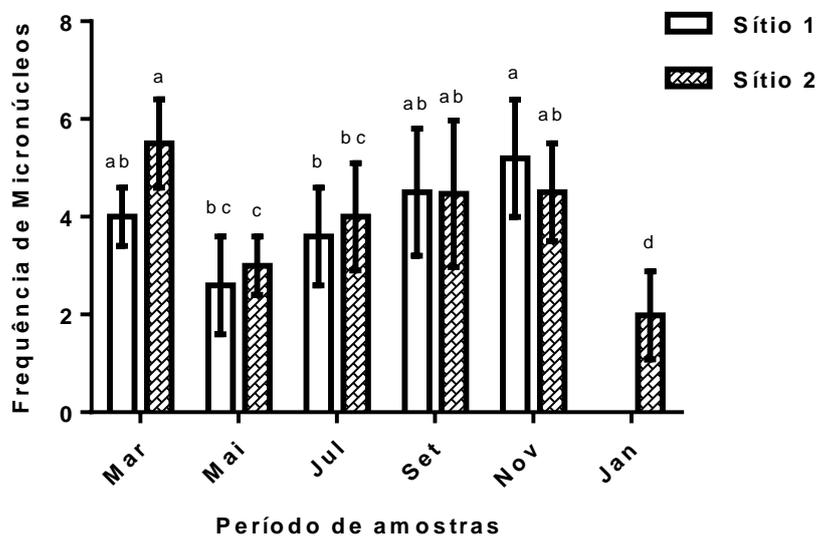
Figura 21- Células de eritrócitos de pirambeba (*S. brandtii*): A) sem formação de MN e B) com MN formados.



Fonte: Autora, 2014.

A avaliação do teste de micronúcleo no presente estudo foi realizada comparando-se a frequência de MN encontrada em cada sítio de amostragem ao longo do período estudado. As médias foram calculadas e aplicadas no teste de Tukey, levando em consideração o nível de significância de 5% (Figura 22).

Figura 22 - Distribuição das frequências de micronúcleos (média e desvio padrão) encontrados em eritrócitos de pirambeba (*S. brandtii*) capturadas nos dois sítios de coleta localizados no reservatório Itaparica PE/BA no período de mar/12 à jan/13.



Obs: não houve captura no sítio1 para o mês de janeiro. Letras diferentes correspondem a diferença significativa pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$) observado.

No sítio 1, a diferença significativa foi observada entre os meses de julho e novembro/12, contudo os meses de março, maio e setembro/12 que tiveram mesma condição de volume de água que o mês de julho/12 não diferiram significativamente. Para o sítio 2 também foi observado diferença significativa, no entanto isso ocorreu nos meses de março e maio/12 e janeiro /13.

Também resultados confirmados por Silva e Nepomuceno (2010), utilizando eritrócitos de mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*) em teste de MN, mostraram diferença significativa encontrada em peixes amostrados no rio Paranaíba (Patos de Minas - MG), receptor de efluentes agro-industriais, em pontos de coleta à montante e à jusante da referida cidade que evidenciou presença de substâncias e/ou condições ambientais com potencial genotóxico. No entanto, Bucker et al, (2006) não observaram diferenças significativas na frequência de MN em *Eingermannia virescens* (peixe elétrico) exposto ao benzeno em diferentes tempos de exposição, não sendo possível detectar efeitos mutagênicos significativos nos eritrócitos analisados.

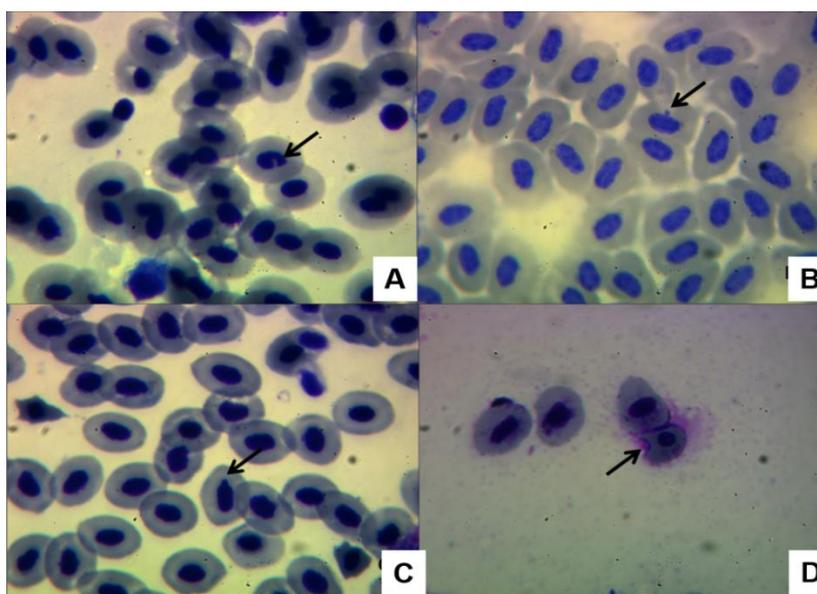
5.3.3.2 Anormalidades Nucleares (AN)

Durante as análises, alguns autores costumam observar as anormalidades nucleares (AN), sugerindo que essas anormalidades sejam levadas em consideração durante a análise convencional de micronúcleos, pois podem estar relacionadas aos processos de citotoxicidade, ações sobre a divisão celular e a genotoxicidade ou mutagenicidade. Em peixes, algumas anormalidades nucleares são registradas após a exposição a substâncias químicas ou poluentes da água (SOUZA e FONTANELLI, 2006).

Anormalidades nucleares têm sido estudadas em organismos aquáticos nos programas de biomonitoramento em que os estudos genotóxicos foram integrados ao foco da investigação (CARRASCO et al, 1990; AL-SABIT e METCALFE, 1995; GRISOLIA, STARLING, 2001; PORTO et al, 2005; AZEVEDO et al, 2012).

As anormalidades nucleares registradas no presente estudo foram eritrócitos analisados com alterações na morfologia nuclear como células com núcleo blebbed, células com núcleo lobed, células com núcleo notched e células com núcleo vacuolated, segundo Carrasco; Tilbury; Myers (1999) e Ventura et al. (2008). (Figura 23).

Figura 23 - Anormalidades nucleares a) célula com núcleo notched; b) célula com núcleo blebbed; c) célula com núcleo lobed; d) célula com núcleo vacuolated.



Fonte: Autora, 2014.

Na Tabela 7 estão representados os valores das médias e desvios padrões calculados da análise de eritrócitos do sangue periférico dos peixes para verificação da incidência de anormalidades nucleares entre os sítios de amostragens para cada um dos meses estudados.

De modo geral, as maiores freqüências de anormalidades nucleares foram observadas no sítio 1, quando comparadas ao sítio 2, ao longo do período de amostragem. Todavia, as anormalidades nucleares não indicaram um claro perfil de aumento ou de decaimento nos resultados obtidos nos sítios estudados ao longo do período de coleta.

Diferenças estatísticas significativas foram averiguadas nas freqüências das alterações morfológicas nucleares nos meses de novembro/12 (blebbed) e setembro/12 (vacuolated), ambas no sítio 1 (Tabela 7). Pode-se indagar que os agroquímicos que provavelmente provocariam tais alterações, possivelmente não estiveram presentes nos sítios estudados em quantidade suficiente para causar tais anormalidades.

Alguns trabalhos publicados têm mencionado associação entre frequência de anormalidades nucleares e exposição a compostos genotóxicos (PACHECO e SANTOS, 1996; AYLLON e GARCIA-VAZQUEZ, 2000; FERRARO et al., 2004). Bombail et al., 2001 encontraram freqüências elevadas de tais anormalidades em peixes que habitam locais poluídos, ou que são expostos a diferentes químicos. Entretanto, Ayllon e Garcia-Vazquez, (2000) não observaram correlação entre aumento de micronúcleos, que consiste em um marcador de genotoxicidade reconhecido, e aumento de anormalidades nucleares, o que sugere a existência de diferenças (em relação à natureza química da substância, dose, tempo de exposição) no surgimento destes marcadores, pelo menos para alguns compostos (VILCHES, 2009).

Tabela 7 - Frequência média de alterações morfológicas nucleares em eritrócitos de *S. brandtii* separadas entre blebbed, lobbed, notched e vacuolated.

Período de coleta	BLEBBED		LOBBED		NOTCHED		VACUOLATED	
	Sítio 1	Sítio2	Sítio 1	Sítio2	Sítio 1	Sítio2	Sítio 1	Sítio2
Março	0,54±0,24 ^b	0,31±0,14 ^{bc}	0,49±0,20 ^{ab}	0,27±0,13 ^{ab}	0,18±0,06 ^{ab}	0,15±0,07 ^a	0,12±0,04 ^b	0,10±0,01 ^a
Maio	0,56±0,20 ^b	0,44±0,13 ^{bc}	0,47±0,18 ^{ab}	0,30±0,10 ^a	0,18±0,07 ^{ab}	0,12±0,04 ^a	0,12±0,02 ^b	0,10±0,01 ^a
Julho	0,61±0,20 ^b	0,29±0,10 ^c	0,28±0,09 ^b	0,14±0,07 ^b	0,12±0,04 ^b	0,11±0,04 ^a	0,12±0,04 ^b	0,12±0,04 ^a
Setembro	0,69±0,50 ^b	0,51±0,20 ^{ab}	0,40±0,18 ^b	0,31±0,12 ^a	0,28±0,12 ^a	0,17±0,06 ^a	0,30±0,17 ^a	0,13±0,06 ^a
Novembro	1,10±0,26 ^a	0,69±0,18 ^a	0,67±0,18 ^a	0,34±0,10 ^a	0,21±0,20 ^b	0,17±0,08 ^a	0,14±0,05 ^b	0,13±0,05 ^a

Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Valores expressos em média e desvio padrão.

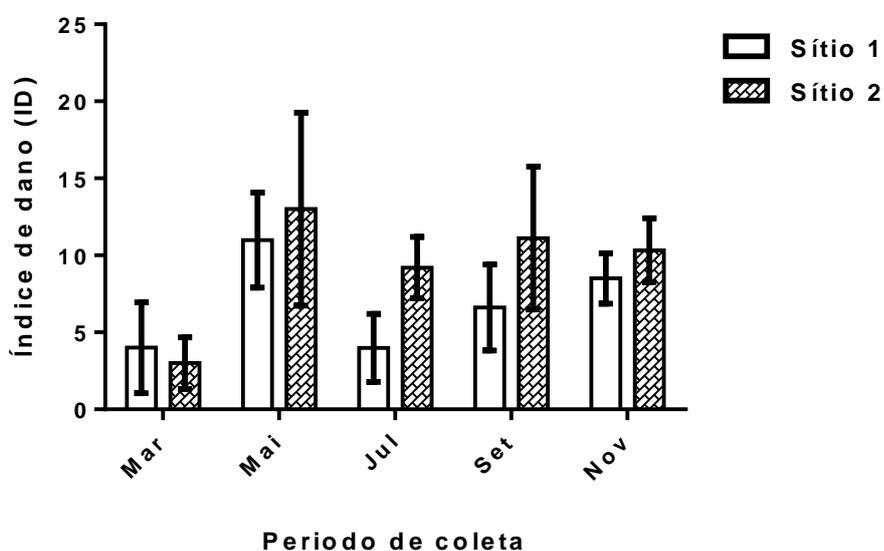
5.3.4 Avaliação da genotoxicidade através do ensaio do cometa

Os danos mais importantes a nível molecular são, sem dúvida, os vários tipos de danos causados ao DNA, incluindo as quebras, que são facilmente visualizadas através do ensaio Cometa (JHA, 2008).

O ensaio Cometa (Eletroforese em Gel de Célula Única) foi aplicado ao estudo do potencial genotóxico em exposição a eritrócitos de *S.brandtii*.

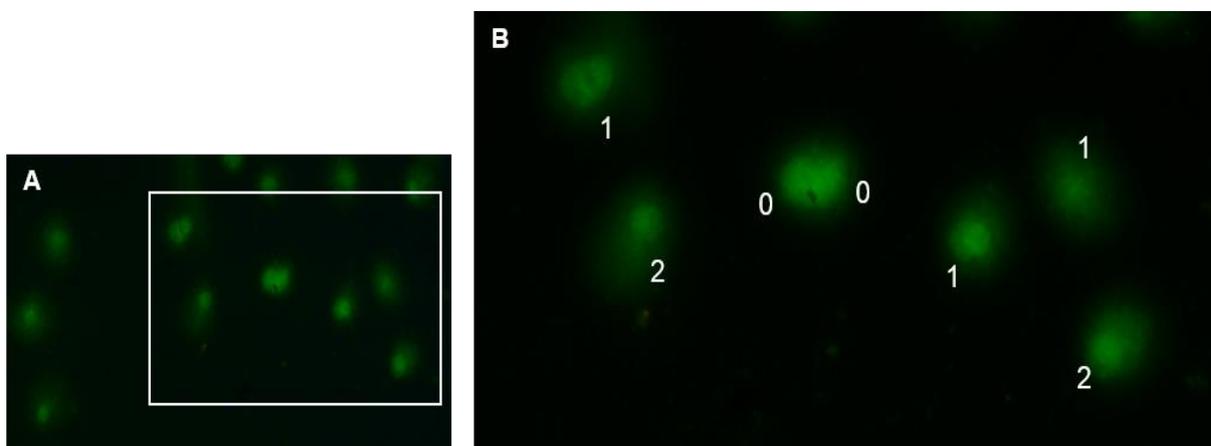
Os resultados dessas análises estão demonstrados na Figura 24 que apresenta os índices de danos (ID) obtidos em células de pirambeba, bem como nas Tabelas 8 e 9 que apresentam as freqüências médias das classes de danos nos sítios de amostragem. As amostras de sangue coletadas para análise de danos no em janeiro/13 não apresentaram qualidade satisfatória e foram descartadas.

Figura 24 - Índice de danos (ID) obtidos de eritrócitos de *S brandtii* nos dois sítios de coleta no período entre mar/12 e nov/12.



Alguns autores trabalham com as classes de 0 a 4, onde nessa última classe são atribuídas células em apoptose (FERRARO et al, 2004; RIVERO, 2007). No presente trabalho, foram identificadas as classe 0 (dano ausente) e as classes 1 e 2 apresentando dano leve e moderado, respectivamente (Figura 25).

Figura 25 - Ensaio cometa: células de sangue da espécie *S. brandtii* mostrando as classes de danos visualizadas. (A) Imagem com aumento de 200x; (B) Imagem com aumento de 400x.



Fonte: Autora, 2013

Observou-se que os maiores valores dos índices de danos nos sítios 1 e 2 foram apresentados no mês de maio ($10,9 \pm 3,08$ e $13,0 \pm 6,27$; respectivamente) (Tabelas 8 e 9), em função dos maiores valores das frequências médias de células obtidas na classe 2 que segundo classificação de Collins et al. (2008) representa um dano moderado. Para o presente estudo, a classe 2 representou o grau máximo de quebras sofridas pelas moléculas de DNA, portanto esses resultados sugerem que provavelmente uma ação genotóxica mais atenuada dos poluentes tenha ocorrido no mês de maio/12. Desse modo, algum fator pode ter possivelmente interferido nesse resultado, tal como acentuada aplicação de agroquímicos ou uma irrigação mais intensificada.

Tabela 8 - Frequências das classes de cometa de pirambeba coletadas no sítio 1 localizado no reservatório Itaparica - PE/BA durante o período de mar/12 a nov/12.

ENSAIO COMETA ALCALINO					
NÍVEIS DE DANOS NO DNA					
Mês de Coleta	Classe 0	Classe 1	Classe 2	Classe 3	ID / U. A.
Março	96,00±1,47	4,00 ±1,47	0 ± 0	0 ± 0	4,00±2,94
Maio	89,71±1,71	9,57 ±1,07	0,71 ±0,71	0 ± 0	10,9±3,08
Julho	96,14±1,24	3,71±1,13	0,14±0,14	0 ± 0	3,99±2,21
Setembro	93,50± 1,43	6,37±1,41	0,12±0,12	0 ± 0	6,62±2,79
Novembro	91,50±0,67	8,50±0,67	0 ± 0	0 ± 0	8,50±1,64

ID: calculado multiplicando o número de núcleos encontrados em uma classe vezes o número da classe. Valores expressos em média e desvio padrão.

Tabela 9 - Frequências das classes de cometa de pirambeba coletadas no sítio 2 localizado no reservatório Itaparica - PE/BA durante o período de mar/12 a nov/12.

ENSAIO COMETA ALCALINO					
NÍVEIS DE DANOS NO DNA					
Mês de Coleta	Classe 0	Classe 1	Classe 2	Classe 3	ID / U. A.
Março	97,00±0,68	3,00 ± 0,68	0 ± 0	0 ± 0	3,00±1,67
Maio	87,80±4,13	11,40±3,48	0,80±0,80	0 ± 0	13,0±6,27
Julho	91,20±1,20	8,40±1,08	0,40±0,40	0 ± 0	9,20±1,99
Setembro	88,88±1,12	11,12±1,12	0 ± 0	0 ± 0	11,12±4,63
Novembro	89,67±1,20	10,33±1,20	0 ± 0	0 ± 0	10,33±2,08

ID: calculado multiplicando o número de núcleos encontrados em uma classe vezes o número da classe. Valores expressos em média e desvio padrão.

Diferente da proposta inicial, limitações e percalços ocorridos durante o período de estudo mencionados anteriormente, guiaram a pesquisa sem a possibilidade de manter um controle, quer fosse um ponto de coleta quer fosse uma espécie capturada em condições controladas, norteando a interpretação dos resultados apenas entre os meses de coleta e entre os sítios de amostragens.

O grau de poluição de um ambiente aquático pode sofrer influência de condições hidrológicas e climáticas. Variações sazonais desses fatores têm um grande efeito na concentração de poluentes no meio aquático (VEGA et al., 1998,

FERREIRA et al., 1994). Quando a pluviosidade é diminuída drasticamente, o volume de água do reservatório tende a diminuir fator, que provavelmente contribui para uma maior concentração de poluentes genotóxicos, acarretando possivelmente em maiores danos de DNA. Também devem ser levados em consideração os plantios de culturas na região durante o período estudado.

Uma análise comparativa entre os biomarcadores genotóxicos estudados (teste do MN, anormalidades nucleares e ensaio do Cometa) foi realizada e foram constatados comportamentos distintos ao longo do período estudado.

O teste do MN apresentou de uma forma geral, a partir do mês de maio/12, um crescimento mostrado pelas frequências de MN em espécimes de *S. brandtii* nos sítios estudados, culminando com a maior frequência de MN obtida em novembro/12 no sítio 1 (Figura 22). A diminuição do volume de água no reservatório Itaparica no mês de novembro/12, possivelmente aumentou a concentração de partículas sólidas na água, dificultando a dissolução do oxigênio. Também, esse volume reduzido de água provavelmente poderia ter aumentado a concentração em g/L de algum agroquímico naquele ambiente. Corroborando com essa afirmação, tivemos a significância estatística nesse mesmo mês.

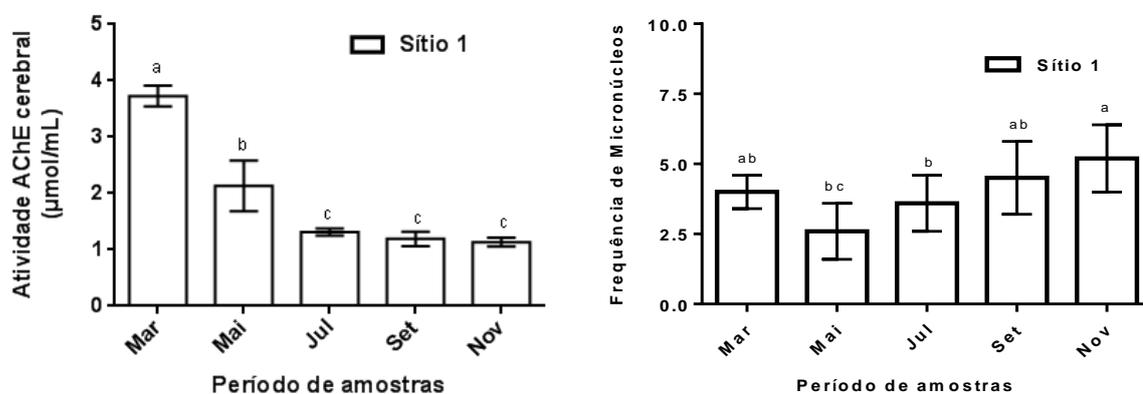
Situação diferente foi mostrada pelas anormalidades nucleares analisadas nos eritrócitos de *S. brandtii*, cujos resultados não possibilitaram possíveis evidências às exposições com agroquímicos nos locais de amostragens durante o período do estudo.

Os resultados mostrados pelo ensaio Cometa não demonstraram um perfil ao longo dos meses estudados, embora foi observada uma possível detecção de ação genotóxica no mês de maio/12.

Finalmente, comparando o perfil dos biomarcadores bioquímicos e genotóxicos pode ser observado um perfil nas respostas, visto que os espécimes do sítio 1 tiveram um decaimento significativo na AChE cerebral em novembro/12 e aumento significativo na frequência de MN nos eritrócitos (Figura 26), indicando que uma possível mudança ambiental ocorrida no referido sítio induziu uma resposta significativa nos biomarcadores bioquímico e genotóxico referidos. Apesar de não ter havido variação significativa no conteúdo protéico no extrato de cérebro dos espécimens do sítio 1, houve o decaimento significativo da atividade de AChE cerebral expressa em $\mu\text{mol/mL}$ ao longo do período amostrado neste sítio, resultante de uma possível inibição de AChE por algum xenobiótico.

Do ponto de vista da resposta de biomarcadores, podemos inferir que a combinação de AChE cerebral e o teste do micronúcleo mostrou uma resposta suficientemente sensível para serem empregados concomitantemente no biomonitoramento com *S. brandtii*.

Figura 26 - Perfil da AChE cerebral e o teste de micronúcleo em eritrócitos de *S. brandtii* ao longo do período amostrado.



6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos podemos concluir que:

Os biomarcadores estudados mostraram diferentes comportamentos nos espécimes de *S. brandtii* dos dois sítios ao longo do período de amostragem;

A AChE cerebral de *S. brandtii* mostrou um perfil significativo de decaimento no sítio 1 ao longo do período estudado;

A AChE muscular foi mais sensível ao carbamato de eserina que a AChE cerebral;

Os resultados da atividade BChE cerebral e muscular não apresentaram um perfil representativo ao longo do período estudado;

Dentre os biomarcadores genotóxicos testados, os resultados mostraram que o teste de MN foi considerado o mais indicado para a espécie *S. brandtii*;

AChE cerebral apresentou no sítio 1 um decaimento significativo no mesmo período em que a frequência de MN apresentou aumento significativo, mostrando possivelmente uma mudança ambiental no referido sítio identificada pela resposta dos biomarcadores bioquímico e genotóxico;

S. brandtii pode ser a espécie sentinela para a região do submédio São Francisco, visto que esteve presente no rio em todas as coletas, mesmo durante o período mais rigoroso de estiagem e baixo nível da água, como também por apresentar relação direta com a atividade de AChE e a formação de MN.

7 PERSPECTIVAS

Expansão da quantidade de sítios de amostragem a jusante e a montante dos já existentes para ampliação da área de abrangência, como também da quantidade de pontos de coleta;

Os resultados obtidos poderão servir de suporte para instituições de ensino superior, órgãos municipais e empresas privadas, trabalharem juntos nas tomadas de decisões relativas ao manejo correto dos agroquímicos, possibilitando um projeto de biomonitoramento ambiental mais abrangente.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, S. M. Biological indicators of aquatic ecosystem stress. **American Fisheries Society**, 2002. ISBN 1888569433.
- AGOSTINHO, Â. A.; THOMAZ, S. M.; GOMES, L. C. Conservação da biodiversidade em águas continentais do Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 70-78, 2005.
- AKAISHI F. M. - **Aplicação de biomarcadores de contaminação ambiental em estudos de laboratório e monitoramento em campo**, 2003 – Dissertação – Paraná -UFPR.
- AKAISHI, F. et al. Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 46, n. 2, p. 244-253, 2004.
- ALPUCHE-GUAL L., Gold-Bouchot G. - Determination of esterase activity and characterization of cholinesterases in the reef fish *Haemulon plumieri* - **Ecotoxicology and Environmental Safety** 71 (2008) 787–797.
- AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 343, n. 2, p. 121-135, 1995.
- ANDRADE, V. M.; T.R.O.FREITAS & J.SILVA. 2004. Comet assay using mullet (*Mugil* sp.) and sea catfish (*Netuma* sp.) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. **Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutag**, 560:57-67.
- ANVISA 2012. Seminário de mercado de agrotóxico e regulação. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, 11 abril de 2012.
- ARAÚJO, A.S. **Variação temporal da frequência de captura e sazonalidade reprodutiva de *Prochilodus cearenses* Steindachener, 1911 (Characiformes, Prochilodontidae) no açude Itans, Caíco/RN**. Dissertação (Mestrado em Psicobiologia), Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal 86p, 1998.
- AYLLÓN, F. et al. Conventional armament wastes induce micronuclei in wild brown trout *Salmo trutta*. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 470, n. 2, p. 169-176, 2000.
- AZEVEDO J. S., BRAGA E. de S., OLIVEIRA RIBEIRO C. A.. Nuclear abnormalities in erythrocytes and morphometric indexes in the catfish *Cathorops spixii* (Ariidae) from different sites on the southeastern Brazilian coast. **Brazilian Journal of Oceanography**, 60(3):323-330, 2012.

BARBOSA, J. M., 1980, Ocorrência de peixes da subfamília Serrasalminae (Osteichthyes, Characidae), no Piauí, Brasil. **Rev. Nordest. Biol.**, 3(especial): 91-100.

BENINCÁ, C. et al. Chronic genetic damages in *Geophagus brasiliensis* exposed to anthropic impact in Estuarine Lakes at Santa Catarina Coast–Southern of Brazil. **Environmental monitoring and assessment**, v. 184, n. 4, p. 2045-2056, 2012.

BISTONI, M.A & J.G. HARO. 1995. Habitas alimentarias de *Serrasalmus spilopleura* (Pisces, Serrasalminae) en los banados del río Dulce (Córdoba, Argentina). **Rev. Brasil. Biol** 55: 847-853.

BOCQUENÉ, G.; GALGANI, F.; TRUQUET, P. Characterization and assay conditions for use of AChE activity from several marine species in pollution monitoring. **Marine Environmental Research**, v. 30, n. 2, p. 75-89, 1990.

BOLOGNESI, C.; BUSCHINI, A.; BRANCHL, E.; CARBONI, P.; FURLINI, M.; MARTINO, A.; MONTEVERDEA, M.; POLI, P.; ROSSI, C. Comet and micronucleus assay in zebra fish mussel cell for genotoxicity assessment of surface drinking water treated with three different disinfectants. **Science of the Total Environment**, v. 333, p. 127-136, 2004.

BOMBAIL, V. et al. Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholisgunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. **Chemosphere**, v. 44, n. 3, p. 383-392, 2001.

BRADFORD, M. M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.

BRESLER, V. et al. Marine molluscs and fish as biomarkers of pollution stress in littoral regions of the Red Sea, Mediterranean Sea and North Sea. **Helgoland Marine Research**, v. 53, n. 3-4, p. 219-243, 1999.

BRITSKI, H. A., SATO, Y. & ROSA, A. B. S., 1988, Manual de identificação de peixes da região de Três Marias. 3. ed. CODEVASF, Brasília, 115p.

BÜCKER, A.; CARVALHO, W.; ALVES-GOMES, J. A. Avaliação de mutagenicidade and genotoxicidade in *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) exposed to benzene. **Acta amazonica**, v. 36, n. 3, p. 357-364, 2006.

BÜCKER, A.; CONCEIÇÃO, M. Avaliação da genotoxicidade por frequência de Micronúcleos em eritrócitos de tilápias expostas às águas do Rio Itajaí-Açú e Itajaí-Mirim, Santa Catarina-Brasil. CONGRESSO BRASILEIRO DE ECOTOXICOLOGIA, 2004.

BUSSOLARO, D. **Diferentes abordagens para a avaliação da exposição de peixes de água doce ao MeHg, PCBs, pesticidas organoclorados e nanopartículas de prata.** 2010. Universidade Federal do Paraná.

CAJARAVILLE, M. P. et al. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **Science of the Total Environment**, v. 247, n. 2, p. 295-311, 2000.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M. S. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 47, n. 11, p. 2123-2136, 1990.

CHUNG, H. W.; KANG, S. J.; KIM, S. Y. A Combination of the micronucleus assay and a FISH technique for evaluation of the genotoxicity of 1, 2, 4-benzenetriol. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 516, n. 1, p. 49-56, 2002.

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

COLLINS, A. R. et al. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 143-151, 2008.

COLLINS, A. R.; AI-GUO, M.; DUTHIE, S. J. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. **Mutation Research/DNA Repair**, v. 336, n. 1, p. 69-77, 1995.

CHESF - Companhia Hidro Elétrica do São Francisco. **Inventário dos Ecossistemas Aquáticos do Baixo São Francisco. Reservatório de Itaparica, 2010**. 2º. Relatório Anual, Dezembro/2008 a Novembro/2009.

COMPANHIA HIDRO ELÉTRICA DO SÃO FRANCISCO (CHESF) – Departamento de Recursos Hídricos e Estudos Energéticos (DHE). **Sistema de Controle e Gerenciamento de Dados Hidrológicos**. Recife. 2013.

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

DE LA TORRE, F. R.; FERRARI, L.; SALIBIÁN, A. Biomarkers of a native fish species (*Cnesterodondecem maculatus*) application to the water toxicity assessment of a peri-urban pollute driver of Argentina. **Chemosphere**, v. 59, n. 4, p. 577-583, 2005.

DE LA TORRE, F.; FERRARI, L.; SALIBIÁN, A. Fresh water pollution biomarker: response of brain acetylcholinesterase activity in two fish species. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 131, n. 3, p. 271-280, 2002.

DE LA TORRE F. R, SALIBIAN A., FERRARI L., Assessment of the pollution impact on biomarkers of effect of a freshwater fish. **Chemosphere** 68 (2007) 1582–1590.

DIPAOLLO, C. **Aplicação do Ensaio Cometa a estudos de danos ao DNA de robalos, *Centropomus parallelus* (Poey, 1860) expostos a B-naftoflavona.** Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo – Instituto Oceanográfico. São Paulo, 2006.

DOMINGOS, F. X. V. **Biomarcadores de contaminação ambiental em peixes e ostras de três estuários brasileiros e cinética de derivados solúveis do petróleo em peixes.** 2006. Universidade Federal do Paraná

DURIEUX, E. D. et al. Natural factors to consider when using acetylcholinesterase activity as neurotoxicity biomarker in Young-Of-Year striped bass (*Morone saxatilis*). **Fish physiology and biochemistry**, v. 37, n. 1, p. 21-29, 2011.

DUTTA, H. M.; ARENDS, D. A. Effects of endosulfan on brain acetylcholinesterase activity in juvenile bluegill sunfish. **Environmental research**, v. 91, n. 3, p. 157-162, 2003.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; FEATHERSTONE, R. M. A New and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88-95, 1961.

FERRARO, M. V.M; FENOCCHIO A. S.; MANTOVANI, M.S; RIBEIRO C.O.; CESTARI, M.M. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead on the fish *H. malabaricus* as evaluated used the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. **Mutation Research**, 27:103-107. 2004.

FLAMMARION, P. et al. Multibiomarker responses in fish from the Moselle River (France). **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 51, n. 2, p. 145-153, 2002.

FLEEGER, J. W.; CARMAN, K. R.; NISBET, R. M. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. **Science of the Total Environment**, v. 317, n. 1, p. 207-233, 2003.

FONTENELE, O. Contribuição para o conhecimento da biologia do apaiari *Astronotus ocellatus* em cativeiro. Aparelho de reprodução, hábitos de desova e prolificidade. **Rev. Bras. Biol**, p. 467-484, 1982.

FONTENELE, O.; NEPOMUCENO, F. Exame dos resultados da introdução do *Astronotus ocellatus ocellatus* (Agassiz, 1849), em açudes do Nordeste do Brasil. **Boletim Técnico do DNOCS**, v. 41, p. 85-99, 1983.

FORMIGLI, LM.; FERRARI, I.; GRISOLIA, CK. Evaluation of genotoxic and cytotoxic potential of thiol (N-2-Mercaptopropionyl glycine), a medicine used in the treatment of humans contaminated with mercury. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. 39:18-21. 2002.

FREITAS, C. E. C.; SIQUEIRA-SOUZA, F. K. O uso de peixes como bioindicador ambiental em áreas de várzea da bacia amazônica. **Revista Agrogeoambiental**, v. 1, n. 2, 2009.

FRENZILLI, G.; NIGRO, M.; LYONS, B. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 681, n. 1, p. 80-92, 2009.

GALGANI, F.; BOCQUENÉ, G.; CADIOU, Y. Evidence of variation in cholinesterase activity in fish along a pollution gradient in the North Sea. **Marine Ecology Progress Series**, v. 91, n. 1-3, 1992.

GALLI, P. et al. Water quality as a determinant of the composition of fish parasite communities. **Hydrobiologia**, v. 452, n. 1-3, p. 173-179, 2001.

GLOVER, A. G.; SMITH, C. R. The deep-sea floor ecosystem: current status and prospects of anthropogenic change by the year 2025. **Environmental Conservation**, v. 30, n. 03, p. 219-241, 2003.

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** (62), 237 – 241, 2005.

GLUSCZAK, L. et al. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 146, n. 4, p. 519-524, 2007.

GLUSCZAK, L. et al. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 65, n. 2, p. 237-241, 2006.

GRISOLIA, C. K. et al. Genotoxicity evaluation of domestic sewage in a municipal wastewater treatment plant. **Genetics and molecular Biology**, v. 28, n. 2, p. 334-338, 2005.

GRISOLIA, C. K.; STARLING, F. L. Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 491, n. 1, p. 39-44, 2001.

GROVER, I.; KAUR, S. Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by the *Allium* root anaphase aberration and micronucleus assays. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 426, n. 2, p. 183-188, 1999.

HANSON, N. Utility of biomarkers in fish for environmental monitoring. **Integrated environmental assessment and management**, v. 5, n. 1, p. 180-181, 2009.

HOOFTMAN, R. N.; DE RAAT, W. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mud minnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate. **Mutation Research Letters**, v. 104, n. 1, p. 147-152, 1982.

HOSE, J. E. et al. Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminated sites off southern California. **Marine Environmental Research**, v. 22, n. 3, p. 167-176, 1987.

JHA, A. N. (2008). Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. **Mutagenesis**. v. 23 n. 3 p. 207–221.

KIRBY, M. et al. The Use of Cholinesterase Activity in Flounder (*Platichthys flesus*) Muscle Tissue as a Biomarker of Neurotoxic Contamination in UK Estuaries. **Marine Pollution Bulletin**, v. 40, n. 9, p. 780-791, 2000.

LAJMANOVICH, R. C. et al. Micronucleus induction in erythrocytes of the *Hyla pulchella* tadpoles (Amphibia: Hylidae) exposed to insecticide endosulfan. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 587, n. 1, p. 67-72, 2005.

LEMOS, N. G. et al. Evaluation of environmental Waters using the comet assay in *Tilapia rendalli*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 19, n. 2, p. 197-201, 2005.

LEVARIO-CARRILLO, M. et al. Micronucleus frequency in human umbilical cord lymphocytes. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 586, n. 1, p. 68-75, 2005.

Linde, AR, Inácio, AF, Novo, LA, Viana, TAP, Albuquerque, C. Utilização de Bioindicadores como ferramentas de monitoramento e avaliação ambiental: o caso de recursos hídricos. **Mundo & Vida**, 2005.

LINDE-ARIAS, A. R. et al. Biomarkers in an invasive fish species, *Oreochromis niloticus*, to assess the effects of pollution in a highly degraded Brazilian River. **Science of the total environment**, v. 399, n. 1, p. 186-192, 2008.

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** (2007) 33:29–34.

MA, T.-H. et al. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 334, n. 2, p. 185-195, 1995.

MARC, J.; MULNER-LORILLON, O.; BELLÉ, R. Glyphosate-based pesticides affect cell cycle regulation. **Biology of the Cell**, v. 96, n. 3, p. 245-249, 2004.

MARTINS, S. E.; BIANCHINI, A. Toxicity tests aiming to protect Brazilian aquatic systems: current status and implications for management. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 13, n. 7, p. 1866-1875, 2011.

MATOZZO, V.; TOMEI, A.; MARIN, M. G. Acetylcholinesterase as a biomarker of exposure to neurotoxic compounds in the clam *Tapes philippinarum* from the Lagoon of Venice. **Marine pollution bulletin**, v. 50, n. 12, p. 1686-1693, 2005.

MATSUMOTO, S. T. et al. 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**, v. 29, n. 1, p. 148-158, 2006.

MELO, G. L. de. **Estudo da Qualidade da água no reservatório Itaparica localizado na Bacia do Rio São Francisco**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil. Recife, 2007.

MIRANDA, A. L. **Bioacumulação de poluentes organopersistentes (POP's) em traíras (*Hoplias malabaricus*) e seus efeitos in vitro em célula do sistema imune da carpa (*Cyprinus carpio*)**. 2006. Dissertação (Mestrado em biologia celular) Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

MIRON, D. S., et al. Effects of the herbicides clomazone, quinclorac, and metsulfuronmethyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 61, n. 3, p. 398-403, 2005.

MODESTO, K. A.; MARTINEZ, C. B. Effects of RoundupTransorb on fish: hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. **Chemosphere**, v. 81, n. 6, p. 781-787, 2010.

MØLLER, P. The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 98, n. 4, p. 336-345, 2006.

MONSERRAT, J. M. et al. Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 146, n. 1, p. 221-234, 2007.

MONTEIRO, D. A. et al. Oxidative stress biomarkers in the fresh water characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methylparathion). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 143, n. 2, p. 141-149, 2006.

MONTEIRO, M. et al. Characterization of the cholinesterases present in head tissues of the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: Application to biomonitoring. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 62, n. 3, p. 341-347, 2005.

MOORE, M. N. et al. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 552, n. 1, p. 247-268, 2004.

MOUNEYRAC, C.; AMIARD-TRIQUET, C. Biomarkers of Ecological Relevance in Ecotoxicology. In: (Ed.). **Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology**: Springer, 2013. p.221-236. ISBN 9400750404.

MOZETO, A.A; ZAGATTO, P.A. Introdução de agentes químicos no ambiente. In: ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. (org.). **Ecotoxicologia aquática—Princípios e Aplicações**. São Carlos: Editora RiMa, p.464, 2006.

NELSON, J. S. **Fishes of the World**. John Wiley & Sons, 2006. ISBN 047175644X.

NICARETA, L. **Biomarcadores para a detecção de efeitos subletais causados pela deltametrina em *Ancistrus multispinnis***. 2013.

NICO, L.G. & D.e. TAPHORN. 1988. Food habits of piranhas in the low llanos of Venezuela. **Biotropica** 20: 311-321.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. et al. Evaluation of Tributyltin Subchronic Effects in Tropical Freshwater Fish (*Astyanax bimaculatus* Linnaeus, 1758). **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 51, n. 3, p. 161-167, 2002.

OLIVEIRA, M. M. et al. Brain acetylcholinesterase as a marine pesticide biomarker using Brazilian fishes. **Marine environmental research**, v. 63, n. 4, p. 303-312, 2007.

OLIVEIRA, M. M. et al. Methyl-paraoxon comparative inhibition kinetics for acetylcholinesterases from brain of neotropical fishes. **Toxicology letters**, v. 153, n. 2, p. 247-254, 2004.

PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in the erythrocytes of *Anguilla anguilla* L. exposed either to cyclophosphamide or to bleached kraft pulp mill effluent. **Fresenius Environ. Bull.**, v. 5, p.746-751, 1996.

PALHARES, D.; GRISOLIA, C. K. Comparison between the micronucleus frequencies of kidney and gill erythrocytes in tilapia fish, following mitomycin C treatment. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, n. 3, p. 281-284, 2002.

PAYNE, J. et al. Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. **Marine Pollution Bulletin**, v. 32, n. 2, p. 225-231, 1996.

PORTO, J. I. R.; ARAÚJO, C. S. O.; FELDBERG, E. Mutagenic effects of mercury pollution as revealed by micronucleus test on three Amazonian fish species. **Environ. Res.**, v. 97, p.287-292, 2005.

RIVERO, C. L. G. **Perfil da frequência de micronúcleos e de danos no DNA de diferentes espécies de peixes do Lago Paranoá**, Dissertação, Brasília-DF, Brasil. 2009.

ROBINSON H. MDEGELA, Resto D. Moshia, Morten Sandvik, Janneche U. Assessment of acetylcholinesterase activity in *Clarias gariepinus* as a biomarker of

organophosphate and carbamate exposure. **Skaare Ecotoxicology** (2010) 19:855–863. DOI 10.1007/s10646-010-0466-3.

RODRIGUES, L. **Estudo das Glutation S-Transferases hepáticas solúveis do peixe *Piaractus mesopotamicus Holmberg, 1887* (Pacu)**. 2003. Tese Doutorado, Pós-Graduação em Biologia do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes/UERJ, Rio de Janeiro, RJ.

RODRIGUES, S. R. et al. Cholinesterase (ChE) inhibition in pumpkinseed (*Lepomis gibbosus*) as environmental biomarker: ChE characterization and potential neurotoxic effects of xenobiotics. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 99, n. 2, p. 181-188, 2011.

RODRÍGUEZ-FUENTES, G.; GOLD-BOUCHOT, G. Characterization of cholinesterase activity from different tissues of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Marine Environmental Research**, v. 58, n. 2, p. 505-509, 2004.

RODRÍGUEZ-FUENTES, G.; GOLD-BOUCHOT, G. Environmental monitoring using acetylcholinesterase inhibition in vitro. A case study in two Mexican lagoons. **Marine Environmental Research**, v. 50, n. 1, p. 357-360, 2000.

RUSSO, C. et al. Assessment of environmental stress by the micronucleus test and the Comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 57, n. 2, p. 168-174, 2004.

SALLES C.M.C. et. al. 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. 2006.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 31, n. 1, p. 9-15, 1975.

SILVA C. A. e NEPOMUCENO J. C. Avaliação da frequência de micronúcleos em eritrócitos periféricos de mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*) do rio Paranaíba. **PERQUIRÈRE**. n. 7, vol. 1: 167-179. 2010.

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. – 2013.72 f.:Tese (Doutorado) Universidade Federal de Alagoas - Maceió.

SINDAG (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola), 2009. Available from: http://www.sindag.com.br/noticia.php?News_ID=1399.

SOUZA, T da S.; FONTANELLI, C. S. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes in Nile tilapia exposed to water affected by refinery effluents. **Mutation Research**, 605:87-93. 2006.

SPALDING, R. F. et al. Herbicides in ground waterbeneath Nebraska's management systems evaluation area. **Journal of environmental quality**, v. 32, n. 1, p. 92-99, 2003.

STRYER, L., **Bioquímica**, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro,976p,1990.

STURM, A.; DA SILVA DE ASSIS, H.; HANSEN, P.-D.Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potential use in the monitoring of neurotoxic contamination. **Marine Environmental Research**, v. 47, n. 4, p. 389-398, 1999.

SVERLIJ, S. B.; ROS, A. E.; ORTI, G. **Sinopsis de los datos biológicos y pesqueiros del sábalo, *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1847)**. Food & Agriculture Org., 1993. ISBN 9253033711.

TICE, R. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetictoxicology testing. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.

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

TORTELLI, V. et al. Importance of cholinesterase kinetic parameters in environmental monitoring using estuarine fish. **Chemosphere**, v. 65, n. 4, p. 560-566, 2006.

VALBONESI, P.; SARTOR, G.; FABBRIO, E. Characterization of cholinesterase activity in three bivalves inhabiting the North Adriatic sea and their possible use as sentinel organisms for biosurveillance programmes. **Science of the total environment**, v. 312, n. 1, p. 79-88, 2003.

VALBONESI P., BRUNELLI, F. MATTIOLI M., Rossi T., FABBRIO E. Cholinesterase activities and sensitivity to pesticides in different tissues of silver European eel, *Anguilla anguilla*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C** 154 (2011) 353–359.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57-149, 2003.

VAZZOLER, A. D. de M.(1996) Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática. **EDUEM, Maringá**

VENTURA B, C., DE ANGELIS D. F., MARIN-MORALES M. A. - Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay - **Pesticide Biochemistry and Physiology** 90 (2008) 42–51.

VIEIRA, C. E. D. et al. Integrated biomarker response index using a Neotropical fish to assess the water quality in agricultural areas. **Neotropical Ichthyology**, v. 12, n. 1, p. 153-164, 2014.

VILCHES, M.- **Análise genotóxica do rio Cadeia/RS através do ensaio cometa e teste de micronúcleo e anormalidades nucleares utilizando peixes como bioindicadores** – 2009. 54 f: Dissertação (Mestrado em Qualidade Ambiental) – Feevale, Novo Hamburgo-RS.

APÊNDICE

APÊNDICE A - Atividades AChE em homogenato de células de cérebro de *P. brevis* (curimatã) coletados nos sítios 1 e 2 e piscicultura e de *A. ocellatus* (apaiari) coletados nos sítios 1 e 2 nos meses de março, setembro e novembro/12 no reservatório de Itaparica PE/BA.

Espécie	Periodo de Coleta	Local de coleta	Proteína (mg/mL)	Atividade AChE (µmol/mL)	A.E AChE (µmol.min ⁻¹ /mg prot.)
<i>Prochilodus brevis</i>	Março	Ponto 1	6,470±0,51	2,590±0,020	0,400±0,06
		Ponto 2	6,020±0,95	1,930±0,008	0,320±0,01
		Piscicultura	7,140±1,62	1,360±0,008	0,190±0,02
	Setembro	Ponto 2	7,760±0,30	1,010±0,06	0,131±0,01
		Piscicultura	5,010±0,52	1,907±0,04	0,381±0,01
<i>Astronotus ocellatus</i>	Março	Ponto 2	3,753±0,30	2,930±0,68	0,781±0,09
	Novembro	Ponto 1	5,830±1,13	1,630±0,06	0,279±0,01
		Ponto 2	5,860±0,40	2,050±0,65	0,350±0,11

APÊNDICE B – Média dos dados hidrológicos nos períodos de coleta (ano 2012).

DADOS HIDROLÓGICOS - CHUVAS DIÁRIAS MÉDIA (mm) - ANO 2012									
Mês	Local de Coleta			Período de Coleta	Observações				
	BSF	FLOR	IBÓ		BSF	FLOR	IBÓ		
MARÇO									
MAXIMA	4,1	27,6	25,9	20 a 23	Chuva antes da coleta: 7mm	da	Chuva antes da coleta: 38,7mm	da	Chuva véspera da coleta: 25,9mm
MINIMA	0	0	0						
MÉDIA	2,05	13,8	12,95						
TOTAL	7	41,3	25,9						
MAIO									
MAXIMA	1,5	5	3,6	19 a 21	Chuva período de coleta: 15 mm	de	Chuva após coleta:	pós	Chuva durante coleta: 0,4 mm
MINIMA	0	0	0						
MÉDIA	0,75	2,5	1,8						
TOTAL	2,7	5	4,2						
JULHO									
MAXIMA	9,1	4,1	3,6	19 a 21	Chuva véspera da coleta: 18 mm	da	Chuva antes da coleta: 0,8 mm	da	Chuva véspera da coleta: 3,8 mm
MINIMA	0	0	0						
MÉDIA	4,55	2,05	1,8						
TOTAL	12,6	4,9	10,3						
SETEMBRO									
MAXIMA	0	0	0	13 a 15	Sem chuva		Sem chuva		Sem chuva
MINIMA	0	0	0						
MÉDIA	0	0	0						
TOTAL	0	0	0						
NOVEMBRO									
MAXIMA	0	3,2	30	13 a 15	Sem chuva		Chuva antes da coleta: 3,2 mm	da	Chuva antes da coleta: 30,0 mm
MINIMA	0	0	0						
MÉDIA	0	1,6	15						
TOTAL	0	3,2	34,8						

BSF – Belém do São Francisco; FLOR – Floresta

APÊNDICE C – Média dos dados hidrológicos nos períodos de coleta (ano 2013).

DADOS HIDROLÓGICOS - CHUVAS DIÁRIAS MÉDIA (mm) - ANO 2013							
Mês	Local de Coleta			Período de Coleta	Observações		
	BSF	FLOR	IBÓ		BSF	FLOR	IBÓ
JANEIRO							
MAXIMA	40,1	28,6	66,5	10 a 12	Chuva após coleta	Chuva após coleta	Chuva após coleta
MINIMA	0	0	0				
MÉDIA	20,05	14,3	33,25				
TOTAL	51,2	38,4	79,6				

BSF – Belém do São Francisco; FLOR – Floresta

ANEXOS

ANEXO G – Aprovação do Projeto de Tese pelo Comitê de Ética da UFAL.

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

Maceió – AL, 25/08/2011

Senhor (a) Pesquisador (a), Fabiane Caxico de Abreu Galdino
Sonia Maria Salgueiro
Jaqueline Maria da Silva
Fatima Lucia de Brito dos Santos

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), em 04/08/2011 e com base no parecer emitido pelo (a) relator (a) do processo nº 006258/2011-21 sob o título, **Avaliação da acetilcolinesterase (AChE) como biomarcador de pesticidas e herbicidas em peixes e no sedimento do Reservatório de Itaparica – Submédio São Francisco**, 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.c).

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: agosto de 2012

ANEXO H – Autorização para atividades com finalidade científica.



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 36402-1	Data da Emissão: 31/10/2012 11:51	Data para Revalidação*: 30/11/2013
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Fátima Lúcia de Brito dos Santos	CPF: 695.299.904-30
Título do Projeto: AVALIAÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE (AChE) COMO BIOMARCADOR DE AGROQUÍMICOS EM PEIXES DO RESERVATÓRIO DE ITAPARICA - SUBMÉDIO SÃO FRANCISCO	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS	CNPJ: 24.464.109/0001-48

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	COLETA DE PEIXES	10/2012	03/2014

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA n° 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio n° 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	PETROLANDIA	PE	Rio São Francisco - Reservatório de Itaparica	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Astronotus, Actinopterygii, Prochilodus, Serrasalmus
2	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Serrasalmus (*Qtde: 25), Astronotus (*Qtde: 25), Prochilodus (*Qtde: 25)

* Qtde. de indivíduos por espécie/focalidade/unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 88577223



Página 1/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 36402-1	Data da Emissão: 31/10/2012 11:51	Data para Revalidação*: 30/11/2013
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Fátima Lúcia de Brito dos Santos	CPF: 695.299.904-30
Título do Projeto: AVALIAÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE (AChE) COMO BIOMARCADOR DE AGROQUÍMICOS EM PEIXES DO RESERVATÓRIO DE ITAPARICA - SUBMÉDIO SÃO FRANCISCO	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS	CNPJ: 24.464.109/0001-48

1	Método de captura/coleta (Peixes)	Outros métodos de captura/coleta(Rede de espera com b ³ ias)
---	-----------------------------------	---

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 88577223



Página 2/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 36402-1	Data da Emissão: 31/10/2012 11:51	Data para Revalidação*: 30/11/2013
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Fátima Lúcia de Brito dos Santos	CPF: 695.299.904-30
Título do Projeto: AVALIAÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE (AChE) COMO BIOMARCADOR DE AGROQUÍMICOS EM PEIXES DO RESERVATÓRIO DE ITAPARICA - SUBMÉDIO SÃO FRANCISCO	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS	CNPJ: 24.464.109/0001-48

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 88577223



Página 3/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 36402-1	Data da Emissão: 31/10/2012 11:51	Data para Revalidação*: 30/11/2013
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Fátima Lúcia de Brito dos Santos	CPF: 695.299.904-30
Título do Projeto: AVALIAÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE (AChE) COMO BIOMARCADOR DE AGROQUÍMICOS EM PEIXES DO RESERVATÓRIO DE ITAPARICA - SUBMÉDIO SÃO FRANCISCO	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS	CNPJ: 24.464.109/0001-48

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 88577223



Página 4/4