



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

ISABELLE DE CARVALHO SPINELLI

GENOTOXICIDADE E ALTERAÇÕES NA CAPACIDADE
ANTIOXIDANTE EM TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)
EXPOSTA AO HERBICIDA HEXAZINONA

Rio Largo
2018

ISABELLE DE CARVALHO SPINELLI

GENOTOXICIDADE E ALTERAÇÕES NA CAPACIDADE
ANTIOXIDANTE EM TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)
EXPOSTA AO HERBICIDA HEXAZINONA

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à coordenação do curso de
Zootecnia como parte dos requisitos
necessários à obtenção do título de
Bacharel em Zootecnia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Jerusa Maria de
Oliveira Amorim

Rio Largo
2018

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias
Bibliotecária Responsável: Myrtes Vieira do Nascimento

S757g Spinelli, Isabelle de Carvalho

Genotoxicidade e alterações na capacidade antioxidante em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) exposta ao herbicida hexazinona / Isabelle de Carvalho Spinelli – 2018.

40 f.; il.

Monografia de Graduação em Zootecnia (Trabalho de Conclusão de Curso) – Universidade Federal de Alagoas, Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2018.

Orientação: Prof^a. Dr^a. Jerusa Maria de Oliveira Amorim

Inclui bibliografia

1. Herbicida - Hexazinona. 2. Ecotoxicologia. 3. Peixe – Tilápia do Nilo. I. Título

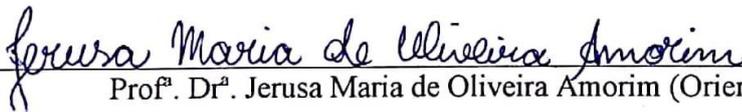
CDU: 661.162.2:639.3

Folha de Aprovação

ISABELLE DE CARVALHO SPINELLI

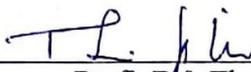
**GENOTOXICIDADE E ALTERAÇÕES NA CAPACIDADE
ANTIOXIDANTE EM TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)
EXPOSTA AO HERBICIDA HEXAZINONA**

Trabalho de conclusão de curso submetido ao corpo docente do curso de Zootecnia da Universidade Federal de Alagoas e aprovado em 22 de novembro de 2018.


Prof.^a. Dr.^a. Jerusa Maria de Oliveira Amorim (Orientadora)

Universidade Federal de Alagoas

Banca Examinadora:


Prof.^a. Dr.^a. Themis de Jesus da Silva (1^o Examinador)

Universidade Federal de Alagoas


Prof.^a. Dr.^a. Misleni Ricarte de Lima (2^o Examinador)

Universidade Federal de Alagoas

Dedicatória...

Dedico primeiramente a Deus.

Dedico este projeto ao grande amor da minha vida, minha mãe e ao meu namorado Pedro.

A todos os meus professores da graduação, em especial aos professores do laboratório professora Themis, Misleni, Emerson e Elton.

A minha orientadora professora Jerusa.

Aos meus amigos de graduação, em especial à minha amiga Iasmin que está comigo desde o começo da vida acadêmica.

A todos os estagiários do Laboratório de Aquicultura e a todos aqueles que de alguma forma contribuíram com meu desenvolvimento.

Agradecimentos

Agradeço a todos do LAQUA por me acolherem e divertirem meus dias durante o decorrer do meu experimento, tornado tudo mais fácil, especialmente a Ceilda e Lisandra que me ajudaram bastante sem pestanejar.

Ao amor da minha vida e a razão de tudo, minha mãe Lidiane, que sempre esteve ao meu lado me dando forças e todo o suporte durante os anos da minha vida acadêmica.

Ao meu namorado Pedro, que sempre esteve ao meu lado, abrindo meus olhos e me dando forças diariamente.

Aos meus zoofriends Iasmin, Jorge, Daniel e Gustavo, que fizeram meus dias mais felizes nesses quase 5 anos.

Agradeço a professora Themis que me deu a oportunidade de realizar meu primeiro projeto PIBIC, acreditando na minha competência para a realização deste trabalho. Se não fosse ela eu não sei do que estaria falando nesse TCC. E a professora Misleni, por todos os ensinamentos e disposição a ajudar sempre.

Um agradecimento especial à minha orientadora maravilhosa, professora Jerusa, por todos os ensinamentos, paciência e puxões de orelha. Por vezes ela quis me dar uns cascudos mas tudo em prol de mim mesma, me sinto feliz e sortuda por ter sido orientada por essa mineira de voz mansa mas que é braba e rígida que só ela, à você toda minha gratidão.

Agradeço também a Deus e à toda a minha família.

RESUMO

O crescimento populacional demanda uma maior produção alimentícia, que para obtenção de maior êxito e evitar a presença de pragas traz como consequência uma maior utilização de herbicidas que podem ser capazes de atingir o lençol freático através da lixiviação no solo causando danos à população aquática. Um herbicida bastante utilizado é o hexazinona (HZN) ($C_{12}H_{20}N_4O_2$) do grupo químico triazinona, classificado como medianamente tóxico. Esse herbicida atingi corpos d'água e pode causar grande impacto no ambiente. Uma forma de mensurar esse impacto é utilizando um bioindicador ambiental, como os peixes. A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758) é um dos peixes mais cultivados e consumidos no Brasil e no mundo. É um animal rústico, resistente a doenças e a alta densidade, sendo um bom animal experimental pois se adapta muito bem ao cativeiro. O objetivo desse trabalho foi investigar se o herbicida hexazinona induz genotoxicidade e alterar a capacidade antioxidante das brânquias do peixe *O. niloticus*. Para isso, foram utilizados 108 animais no total, divididos em seis tratamentos com três repetições cada. Cada repetição continha seis animais por aquário que foram expostos por 96h às concentrações: controle 0,0 mg/L, HZN1 8,8 mg/L, HZN2 17,6 mg/L, HZN3 35,2 mg/L, HZN4 70,4 mg/L e HZN5 140,8 mg/L. Após as 96h os peixes foram anestesiados e o sangue e as brânquias foram retirados. O sangue foi utilizado para realizar os testes de micronúcleo. As brânquias foram utilizadas para análise das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e a glutathione S-transferase (GST) e o produto da peroxidação lipídica através dos níveis de malonaldeído (MDA). Os peixes expostos às concentrações de 17,6 até a 140,8 mg/L mostraram alta frequência de eritrócitos micronucleados. A enzima superóxido dismutase (SOD) apresentou menor atividade nos animais dos grupos expostos à concentração de 140,8 mg/L, e as enzimas CAT e GST, aumentaram em 17,6 e 17,6 a 140,8 mg/L, respectivamente. Não houve diferença no produto da peroxidação lipídica. Os resultados sugerem que o herbicida é capaz de causar genotoxicidade em *O. niloticus* evidenciado pelo teste micronúcleo. A queda na atividade da enzima SOD indica estresse e produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROS). O aumento da enzima GST pode ser um indicativo de proteção celular contra a peroxidação lipídica. Dessa forma, o herbicida hexazinona pode causar danos ao DNA e estresse oxidativo nas brânquias de tilápia do Nilo.

Palavras-chave: biomarcadores, ecotoxicologia, estresse oxidativo, Glutathione S-transferase, micronúcleo.

ABSTRACT

Population growth demands a higher food production, which to achieve greater success and avoid the presence of pests leads to a greater use of herbicides that may be able to reach the water table through leaching in the soil causing damage to the aquatic population. A widely used herbicide is hexazinone (HZN) ($C_{12}H_{20}N_4O_2$) from the chemical group triazinone, classified as moderately toxic. This herbicide has reached water bodies and can cause great impact on the environment. One way to measure this impact is to use an environmental bioindicator, such as fish. Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Linnaeus, 1758) is one of the most cultivated and consumed fish in Brazil and worldwide. It is a rustic animal, resistant to diseases and high density, being a good experimental animal because it adapts very well to the captivity. The objective of this work was to investigate whether the hexazinone herbicide induces genotoxicity and to alter the antioxidant capacity of the gills of *O. niloticus* fish. For this, 108 animals were used in total, divided into six treatments with three replicates each. Each replicate contained six animals per aquarium that were exposed for 96 h at concentrations: control 0.0 mg / L, HZN1 8.8 mg / L, HZN2 17.6 mg / L, HZN3 35.2 mg / L, HZN4 70, 4 mg / L and HZN5 140.8 mg / L. After 96 hours the fish were anesthetized and blood and gills were removed. The blood was used to perform the micronucleus tests. The gills were used for the analysis of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione S-transferase (GST) and lipid peroxidation product through malonaldehyde (MDA) levels. Fish exposed to concentrations of 17.6 up to 140.8 mg/L showed high frequency of micronucleated erythrocytes. The enzyme superoxide dismutase (SOD) showed lower activity in the animals of the groups exposed to the concentration of 140.8 mg/l, and the enzymes CAT and GST, increased in 17.6 and 17.6 to 140.8 mg/l, respectively. There was no difference in the lipid peroxidation. The results suggest that the herbicide is capable of causing genotoxicity in *O. niloticus* evidenced by the micronucleus test. The decrease in the activity of the enzyme SOD indicates stress and excessive production of reactive oxygen species (EROS). The increased GST enzyme indicates cellular protection against lipid peroxidation. The hexazinone herbicide can cause DNA damage and oxidative stress in the gills of Nile tilapia.

Key words: biomarkers, ecotoxicology, glutathione S-transferase, micronucleus, oxidative stress.

Lista de ilustrações

Figura 1 – Estrutura molecular do herbicida hexazinona.....	16
Figura 2 – Aquários experimentais.....	24
Figura 3 – Contaminação dos aquários.....	24
Figura 4 –Coleta de sangue.....	25
Figura 5 – Peixe controle.....	28
Figura 6 – Peixe HZN5 140,8 mg/L.....	28
Figura 7 – Sinais de hemorragia	29
Figura 8 –Eritrócitos micronucleados.....	29
Figura 9 – Frequência de células micronucleadas.....	30
Figura 10– Atividade da SOD.....	31
Figura 11 – Atividade da CAT.....	31
Figura 12 –Atividade da GST.....	31
Figura 13 –Níveis de Malondialdeído (MDA).....	31

Sumário

1	Introdução	10
1.1	Objetivos	12
1.1.1	Objetivo geral.....	4
1.1.2	Objetivos específicos.....	4
2	Revisão de Literatura	13
2.1	Toxicologia.....	13
2.2	Herbicidas.....	13
2.3	Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	16
2.4	Efeitos dos contaminantes ambientais sobre a capacidade antioxidante.....	17
2.5	Genotoxicidade.....	19
2.6	Herbicida hexazinona e seus efeitos para organismos não alvos.....	20
3	Material e métodos	23
3.1	Químicos	23
3.2	Animais e desenho experimental	23
3.3	Micronúcleo.....	25
3.4	Análise da capacidade antioxidante	25
3.4.1	Preparo das amostras	25
3.4.2	Atividade das enzimas antioxidantes.....	26
3.4.3	Determinação do malondialdeído	26
3.5	Análise estatística	27
4	Resultados e discussão.....	28
4.1	Resultados.....	28
4.2	Discussão.....	31
5	Conclusão	34
	Referências bibliográficas.....	35

1 Introdução

O crescimento na produção alimentícia se dá de acordo com o crescimento populacional. Esse crescimento industrial e agrícola traz consigo uma maior demanda de compostos químicos, que são utilizados, por vezes de forma indiscriminada, para prevenção de pragas e acabam contaminando rios, lagos e outros corpos d'água (RODRIGUES, 2014).

O uso destes compostos químicos na agricultura é bastante comum e importante para o bom desempenho da produção dos cultivos, pois é muito comum que apareçam plantas daninhas que se não controladas nos primeiros meses irão se nutrir dos nutrientes do solo causando uma baixa produtividade do cultivo. A cana-de-açúcar é o cultivo de relevância no Brasil, e a principal cultura de Alagoas, e por isso a quantidade de herbicidas utilizados a fim de controlar essas ervas infestantes são grandes (AGRIC, 2011).

Os herbicidas são bastante utilizados para controle de ervas daninhas (NOVACANA, 2013), e um deles é o herbicida hexazinona ($C_{12}H_{20}N_4O_2$), é um herbicida seletivo para algumas espécies e age inibindo o fotossistema II da fotossíntese de seus alvos, porém, é possível encontrar na literatura que esse tipo de herbicida acaba por prejudicar organismos não-alvo, como os peixes. Este herbicida tem fraca ligação com o solo, e, portanto, pode ser facilmente lixiviado para corpos d'água.

A lixiviação é o tipo de transporte que leva os herbicidas a atingirem as sementes ou plântulas em germinação onde os mesmos irão agir as inibindo (OLIVEIRA, 2001). Esse transporte ocorre em todas as direções, mas é dependente da direção do fluxo da água, sendo a principal forma de transporte no solo das moléculas não voláteis e solúveis em água (PRATA et al. 2003). No entanto a lixiviação pode ser prejudicial, já que em excesso contribui para que o herbicida atinja o lençol freático, sendo capaz de causar distúrbios no ecossistema aquático (WAUCHOPE et al. 1990; GISH et al. 1994).

Os herbicidas é o grupo de pesticidas mais encontrado no ambiente, como lagos, rios e mares, o que é preocupante por possuir alto risco de contaminação ambiental dos organismos aquáticos que ali vivem (OLIVEIRA et al. 2001). Uma vez em corpos d'água, herbicidas podem comprometer a saúde da fauna aquática, sendo capaz de causar, em peixes, genotoxicidade e danos à sua capacidade antioxidante (TU et al. 2001)

Uma forma de mensurar o impacto desses herbicidas sobre os organismos aquáticos é através da avaliação do estresse oxidativo, que ocorre devido ao desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e a capacidade da defesa antioxidante (MACHADO et al. 2009). A avaliação do estresse oxidativo consiste em investigar as enzimas envolvidas na biotransformação e defesa antioxidante frente a xenobióticos, como os herbicidas (BARBOSA et al. 2010).

Outra forma de mensurar esses danos é através de análises ao DNA (Ácido desoxirribonucleico), onde é realizado ensaios toxicológicos para determinar os malefícios dos agentes químicos, que interagem com organismos por um determinado período em exposição (OGA et al. 2008). Assim, genotoxicidade é uma especialidade da toxicologia que estuda os efeitos de xenobióticos no DNA ou material cromossômico (DE FLORA e IZZOTTI, 2007), sendo necessário análise sanguínea do indivíduo exposto a esses agentes.

Para a determinação do impacto ambiental dos herbicidas no ambiente aquático se faz necessário análises de um indivíduo ou organismo, sendo o peixe um bom bioindicador para avaliação dos riscos causados por essas substâncias em corpos hídricos (NUNES, 2013). A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é um bom exemplo para utilização na avaliação de contaminantes ambientais. Pertencente a Ordem Perciformes tem origem africana (VERANI, 1980) e responde por 4% da produção aquícola mundial, sendo o terceiro peixe mais cultivado no mundo, ficando atrás das carpas e salmonídeos (FAO, 2010). O Brasil é o quarto maior produtor de tilápia do mundo (PEIXEBR, 2018). Além da carne, seu couro e até a carcaça tem valor comercial.

Os efeitos da exposição a diversos grupos químicos de herbicidas, vem sendo estudados através de organismos modelos, como a tilápia do Nilo, por tenderem a ser compostos reativos capazes de se ligar ao DNA e causar danos ao animal e a quem o consome. Entretanto, se tratando do herbicida hexazona, a quantidade de trabalhos existentes na literatura com relação a seus efeitos em enzimas de biotransformação, no estresse oxidativo e no material genético de animais aquáticos de uma forma geral é irrisória. O presente tem como objetivo avaliar os efeitos do herbicida hexazinona sobre o DNA e capacidade antioxidante das brânquias do peixe *O. niloticus*.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Investigar se o herbicida hexazinona induz genotoxicidade e alterar a capacidade antioxidante das brânquias do peixe *O. niloticus* (Linnaeus, 1758).

1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar danos ao DNA através do teste micronúcleo;
- Avaliar a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) nas brânquias;
- Avaliar a atividade da enzima catalase (CAT) nas brânquias;
- Avaliar a atividade da enzima glutathione S-transferase (GST) nas brânquias;
- Avaliar a peroxidação lipídica através da determinação do malondialdeído (MDA).

2 Revisão de Literatura

2.1 Toxicologia

A toxicologia é a ciência que determina os efeitos danosos de agentes químicos (entidade química capaz de causar dano a um sistema biológico), que interagem com organismos por um determinado período em exposição. Tais efeitos podem variar de leves, como irritação dos olhos, a danos mais sérios, capaz de propiciar mutações ao DNA (Ácido desoxirribonucleico), e pode causar graves distúrbios as funções do organismo levando-o a morte (OGA et al. 2008).

O grau de gravidade dos danos difere em dois contextos, o quantitativo, no qual estão classificadas substâncias que possuem efeitos nocivos em doses altas, no entanto em baixíssimas doses podem ser isentas de perigo. No qualitativo, vai depender da espécie e linhagem, onde o agente tóxico pode não ser nocivo para uma espécie, para outra ele é de alta periculosidade (OGA et al. 2008).

A ecotoxicologia é uma subárea da toxicologia que avalia os efeitos dos agentes tóxicos, naturais ou sintéticos, sobre os organismos vivos do ecossistema, sejam eles animais ou vegetais terrestres ou aquáticos, incluindo assim os impactos derivados da interação das substâncias com o meio onde vivem os organismos (PLAA, 1982).

Para determinar a toxicidade do meio é realizado testes ecotoxicológicos, onde mede-se alterações físicas, morfológicas ou comportamentais, dos organismos vivos que são expostos a diferentes concentrações de agentes danosos para se avaliar sua letalidade, que significa a morte por ação direta. A exposição pode ser de duas formas, a aguda, quando a concentração letal (CL) do agente é dada em alta concentração por um período curto de tempo, e crônica, onde é dado concentrações subletais em eventos periodicamente repetidos durante um período maior de tempo (SCHVARTSMAN, 1991).

2.2 Herbicidas

Na agricultura é comum o uso de herbicidas para que haja sucesso na produção, pois é muito comum o aparecimento de ervas daninhas, que muitas vezes, mas não sempre, são plantas exóticas e infestantes que se alimentam dos nutrientes presentes no solo trazendo como consequência uma queda na produtividade do cultivo. Na cultura da cana-de-açúcar, por exemplo, nos primeiros meses de desenvolvimento essas ervas crescem fortemente se não

controladas com um bom manejo, o que causa perdas (AGRIC, 2011). Para o controle dessas plantas são utilizados os herbicidas (NOVACANA, 2013).

Segundo Kuva et al. (2003), as plantas daninhas competem com a cultura, absorvendo a água e os nutrientes disponíveis no solo, além de bloquear os raios solares. Essa interferência ocasiona uma redução significativa no rendimento da cultura, bem como a diminui a longevidade do canavial e causa dificuldade nas operações de colheita e transporte, tornando-se necessário o uso de herbicidas para controlar a infestação.

Os herbicidas são agentes biológicos que tem por função a erradicação e/ou inibição do crescimento de espécies específicas, dependendo da sua classificação (EMBRAPA, 2005). Os herbicidas são classificados de acordo com seu grupo químico, são eles:

Quadro 1 – Classificação dos herbicidas quanto ao grupo químico.

Grupo 1	Ariloxifenoxipropionatos e Ciclohexanodionaas	Grupo 9	Glicina substituída
Grupo 2	Sulfoniluréias, Triazolpirimidinas, Imidazolinonas e Pyrimidilbenzoatos	Grupo 10	Ácido fosfínico
Grupo 3	Dinitroanilinas	Grupo 12	Piridazinona
Grupo 4	Ácido benzoico, ácidos fenoxicarboxílicos, Ácidos piridincarboxílicos e Ácidos quinolincarboxílicos	Grupo 13	Isoxazolidinona
Grupo 5	Triazinas e Triazinona	Grupo 14	Difeniléteres, N-fenil-ftalimidas, Triazolinona e Oxadiazol
Grupo 6	Benzoatiadizol	Grupo 15	Cloroacetamidas
Grupo 7	Uréias	Grupo 22	Bipiridílios
Grupo 8	Thiocarbamatos	Grupo 28	Isoxazol e Tricetonas

Fonte: EMBRAPA, 2005.

A classificação toxicológica dos herbicidas é dividida em quatro classes de acordo com a Agência nacional de vigilância sanitária - Anvisa (2011), órgão de controle do Ministério da

Saúde. Cada classe possui uma cor específica no rótulo e na bula indicando o nível de periculosidade do produto para a saúde (Quadro 2).

Quadro 2 - Classificação dos herbicidas quanto a toxicidade.

Classe I	Extremamente tóxico	Vermelha
Classe II	Altamente tóxico	Amarela
Classe III	Medianamente tóxico	Azul
Classe IV	Pouco tóxico	Verde

Fonte: Anvisa, 2011.

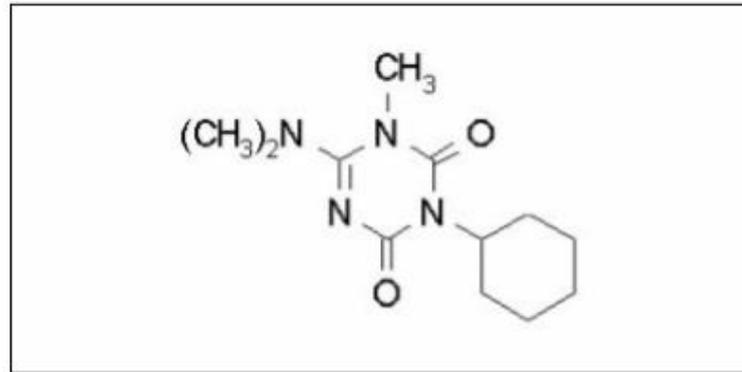
Cada herbicida possui um determinado mecanismo de ação, desses os mais importantes são: mimetizadores da auxina, inibidores da fotossíntese, inibidores da divisão celular, inibidores da PROTOX (enzima protoporfirinogênio oxidase), inibidores da síntese de carotenoides, inibidores da síntese de lipídeos e inibidores da síntese de aminoácidos (OLIVEIRA et al. 2011). O método de aplicação de herbicidas é através da pulverização da substância no solo, que depende do tipo de bico utilizado para garantir sua eficácia. O bico mais utilizado é o hidráulico, que produz gotas de diferentes tamanhos (OLIVEIRA et al. 2011).

A aplicação dos herbicidas ao solo por vezes é em quantidade maior do que a permitida e necessária, devido a isso as plantas não conseguem absorver e aquela substância se encontra no solo podendo ser lixiviada. Isso ocorre porque as interações dos herbicidas com o solo são altamente variáveis e imprevisíveis, podendo através da precipitação atingir o meio ambiente aquático e posteriormente os seres humanos (EMBRAPA, 2011).

Muitos estudos acerca do nível de toxicidade dos herbicidas aos animais e humanos vêm sendo realizados. Em 2015 a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), órgão da Organização Mundial da Saúde (OMS), divulgou que cinco pesticidas são carcinogênicos: tatraclorvinfós, parationa, melationa, diazinona e o glifosato.

A hexazinona é um herbicida utilizado no cultivo da cana-de-açúcar, classificado toxicologicamente na classe III, com fórmula molecular $C_{12}H_{20}N_4O_2$, sendo recomendada sua aplicação em pré e pós-emergência das plantas infestantes (ANVISA, 2006).

Figura 1. Estrutura molecular do herbicida Hexazinona.



Fonte: Anvisa, 2006

O mecanismo de ação do herbicida hexazinona consiste na inibição da fotossíntese de gramíneas e algumas espécies lenhosas. Ele causa a morte da planta pela perda da fotossíntese dos tecidos afetados, destruindo os ácidos graxos nos tilacóides e outras membranas celulares próximas aos locais de produção de radicais livres, e o dano causado por estes radicais livres ele leva a planta a clorose, necrose e morte (OLIVEIRA et al. 2011).

2.3 Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

A piscicultura é uma área que cresce a cada dia no país, segundo levantamento da PeixeBR (2018), em 2017 a produção brasileira atingiu 691.700 toneladas, 8% a mais que em 2016. A maior produção se dá ao cultivo de tilápia, o que coloca o Brasil em um dos quatro maiores produtores de tilápia do mundo.

A tilápia do Nilo é um peixe de origem africana pertencente a Ordem Perciformes (VERANI, 1980). É um dos peixes mais importantes e cultivados do mundo devido a sua rusticidade e adaptabilidade ecológica. Este peixe se expandiu na aquicultura e pode ser encontrado em todos os países (TREWAVAS, 1983; WELCOMME, 1988), se tornando uma das espécies mais bem cultivadas na aquicultura (SURESH, 2003). As tilápias respondem por 4% da produção aquícola mundial, sendo o terceiro peixe mais cultivado no mundo, ficando atrás das carpas e salmonídeos (FAO, 2010).

Os sistemas aquícolas que tiveram a introdução da tilápia do Nilo, obtiveram um aumento na produção de alimentos e redução da pobreza, uma vez que foi criada a aquicultura alternativa e desenvolvido meios de subsistência pesqueira (WISE et al. 2007). Esse

crescimento é favorável em países tropicais e subtropicais, com custo de produção baixo, facilitando o comércio com os EUA (FAO, 2006).

A produção de tilápias apresentam um grande impacto na sociedade, sua produção proporciona um aumento na renda familiar de pequenos produtores, beneficia as mulheres, uma vez que os incubatórios e programas de melhoramento genético empregam muitas mulheres, além de sua produção ser uma fonte geradora de emprego é uma importante fonte de proteína (CABI, 2013).

As tilápias apresentam maturidade sexual entre o 3º e 4º mês após a introdução do alevino (LÈVEQUEU, 2002). São animais de coloração azulada ou acinzentada, que varia dependendo do ambiente em que estão, com presença de listras claras e escuras. Os machos possuem a característica de nadar em cardume, principalmente alevinos e animais jovens (TERRA DA GENTE, 2015). A reprodução dessa espécie é dada por meio da fertilização dos ovos pelo macho, onde o mesmo prepara o ninho para a fêmea depositar os ovos. Após a fertilização, a fêmea incuba os ovos na boca até mesmo depois da eclosão, os alevinos permanecem lá para proteção (CABI, 2013). A Tilápia do Nilo possui características bastante interessantes e de grande valia à piscicultura, são animais rústicos, resistentes a diferentes sistemas de manejo, à doença, à alta densidade, hábito alimentar omnívoro e atingem o peso ideal mais rápido (CASTAGNOLLI, 1992), fazendo com que fosse facilmente disseminada pelo mundo.

Apesar de suas características favoráveis, a Tilápia do Nilo tende a se tornar uma praga, caso sejam soltas no ambiente natural, pois os machos são extremamente territorialistas, competem com as espécies nativas por comida e espaço (TERRA DA GENTE, 2015).

2.4 Efeitos dos contaminantes ambientais sobre a capacidade antioxidante

O ambiente aquático vem sofrendo devido aos xenobióticos que tem sido despejado no mesmo pelas comunidades urbanas, propriedades rurais e indústria, como pesticidas organoclorados, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), bifenilas policloradas (PCBs), dioxinas e furanos (VAN DER OOST et al. 2003). A presença de xenobióticos nos ecossistemas aquáticos vêm crescendo de forma alarmante, podendo afetar os seres vivos que habitam esses ecossistemas e danificar seus sistemas defensivos (ARIAS et al. 2007).

Os seres vivos possuem vasto e complexo sistema de proteção antioxidante, um deles é o mecanismo de defesa contra espécies reativas formadas constantemente no metabolismo celular e em eventos patológicos, como na presença de xenobióticos. A produção dos radicais livres é principalmente realizada na mitocôndria através da cadeia transportadora de elétrons, no momento que há a produção de energia, esse evento também é capaz de ocorrer na membrana celular e no citoplasma (BARBOSA et al. 2010). O elétron que está desemparelhado desses radicais se posiciona no centro dos átomos de oxigênio ou nitrogênio dando origem e denominação as espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (BARREIROS et al. 2006). Entretanto, esses radicais se produzidos em excesso podem causar a oxidação de macromoléculas biológicas, como o DNA e proteínas. Este desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e a capacidade de defesa antioxidante do organismo é denominado estresse oxidativo (MACHADO et al. 2009).

O processo de peroxidação lipídica é um dos principais fatores que causam danos à membrana celular atingida pela ação das EROs e ERNs. A peroxidação lipídica é uma reação à ação dos radicais livres sobre os lipídios. O processo é dado através de um radical livre começam a agredir os ácidos graxos polinsaturados dos fosfolipídeos das membranas das células, causando a desintegração da membrana e possibilitando a entrada da EROs nas estruturas intracelulares. As espécies tóxicas ativam a fosfolipase, pela desintegração dos fosfolipídeos, liberando os ácidos graxos não saturados. Esses levam a formação de aldeídos que são tóxicos para as células e levam a formação de outras espécies reativas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989). Esse processo gera alterações na estrutura e permeabilidade das membranas fazendo com que a seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas sejam perdidos (FERREIRA et al. 1997).

A oxidação de lipídios e proteínas, causada pelo estresse oxidativo, compromete a qualidade de óleos vegetais e da gordura animal acarretando sabores e odores desagradáveis, além de alterações na cor, solubilidade, viscosidade, etc (MOREIRA e MANCINI-FILHO, 2004).

É através de antioxidantes produzidos pelo corpo (enzimáticos) ou absorvidos na dieta (não enzimáticos) que é possível combater o excesso das espécies reativas (BARREIROS et al. 2006). Estes antioxidantes são substâncias capazes de regenerar as moléculas dos reagentes, que são os substratos, ou prevenir significativamente a sua oxidação (HALLIWELL et al. 2000).

Diversas enzimas antioxidantes são sintetizadas na fase I pelas células para que exista equilíbrio na síntese e armazenamento de EROs e ERNs. Podem ser citadas: a Superóxido dismutase (SOD), que catalisa a dismutação do O_2^- , convertendo-o em H_2O_2 (peróxido de hidrogênio), e a Catalase (CAT) que catalisa a formação de água e oxigênio a partir de H_2O_2 . O sistema de defesa antioxidante de fase II inclui as enzimas antioxidante glutathiona S-transferase (GST) e a Glutathiona Redutase (GR), além da proteína glutathiona (GSH) que é oxidada (GSSG) e reduzida (GSH) pela GR em um sistema dependente de NADPH (fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida) (OLIVEIRA e SCHOFFEN, 2010).

A L-Glutathiona redutase (GSH) é um tiol muito importante na defesa celular contra EROs e outros peróxidos, já que possui baixa massa molecular, além de servir como substrato para outras enzimas desintoxicantes (SRIKANTH et al. 2013). A enzima GST promove a conjugação da GSH com produtos endógenos causadores de danos oxidativos promovendo a desintoxicação (DUDLER et al. 1991; BARLING et al. 1993). Esta enzima realiza a catalise da conjugação de glutathiona (GSH) reduzindo a toxicidade de xenobióticos através da produção de conjugados solúveis em água (COLE, 1994; KREUZ et al. 1996).

2.5 Genotoxicidade

Genotoxicidade é um termo da genética que avalia o efeito danoso de substâncias sobre o material genético da célula (DNA, RNA). A genotoxicidade ocorre através de agentes mutagênicos, genotoxinas, que causam mutações ao DNA. As genotoxinas incluem-se substâncias químicas e radiação (DE FLORA e IZZOTTI, 2007).

Há várias formas de identificar os danos causados por agentes tóxicos aos animais, uma delas é o teste micronúcleo, que pode ser realizado *in vivo* ou *in vitro*. *In vivo* os animais são submetidos às substâncias tóxicas afim de induzir danos cromossômicos que serão mensurados através da análise dos eritrócitos presentes na medula óssea e/ou no sangue, com objetivo de avaliar os efeitos citogenéticos de uma determinada substância através do aparecimento de micronúcleos (OECD, 1997).

Os micronúcleos são resultados de uma mutação cromossômico, ocorre a fragmentação do mesmo, onde há um atraso na migração para o polo da célula a nível da anáfase, e quando a célula entra em telófase esses fragmentos são incluídos à célula filha havendo uma fusão com o núcleo principal ou formando um núcleo secundário, que é chamado de micronúcleo (AGOSTINI, 1993).

Bucker et al. (2012) observaram um aumento na quantidade de micronúcleos nas células sanguíneas de peixes elétricos submetidos a concentração de 25 ppm de benzeno por mais de 72 horas, bem como outras anormalidades nucleares.

Astyanax bimaculatus (Lambari) tratados com ciclofosfamida ou sulfato de vinblastina mostraram que a frequência de micronúcleos não diferiu entre as diferentes doses usadas de sulfato de vinblastina. Entretanto ao comparar os tratamentos contaminados com o controle os resultados mostraram preocupantes, devido à alta frequência de micronúcleos em todas as doses quando comparadas ao controle (MATSUMOTO e CÓLUS, 2000).

2.6 Herbicida hexazinona e seus efeitos para organismos não alvos

A classificação toxicológica do herbicida hexazinona de acordo com a Anvisa é mediana, no entanto possui uma ligação fraca com o solo e devido a isso pode contaminar as águas subsuperficiais através da lixiviação. Isso pode prejudicar toda a fauna aquática (TU et al. 2001). Monquero et al. (2008) confirmaram que a mistura dos herbicidas diuron + hexazinona apresenta uma alta lixiviação em solos argilosos (PARAHYBA et al. 2008).

Devido ao fato dos herbicidas possuírem risco tóxico, Lewis et al. (2009) a fim de quantificar esses possíveis danos ao meio ambiente aquático na Austrália, coletaram amostras de água de 76 rios e riachos durante inundações em 3 regiões da grande barreira de coral, sendo áreas contendo mais de 10% de cultivo de cana-de-açúcar, de 0 a 10 % de cultivo de cana-de-açúcar, pastagens sem cana, terras urbanas e subdesenvolvidas. Após análises foi detectado resíduos dos herbicidas diuron, atrazina, hexazinona, ametrina, tebutirao, simazina, metacoloro, bromacil, 2,4-D (Ácido diclorofenoxiacético) e MCPA (Ácido (4-cloro-2-metilfenoxi) acético). Os herbicidas diuron, atrazina, hexazinona e ametrin os que foram detectados em concentrações relativamente altas e de maior incidência em locais onde há a presença da cana-de-açúcar. A presença dessas substâncias no ambiente pode afetar os organismos marinhos de forma negativa, como alterações na estrutura de manguezais, de plantas marinhas e nos ecossistemas dos recifes de corais (LEWIS et al. 2009).

O salmão do atlântico ao ser exposto a uma concentração de 100 µg/L de hexazinona durante 21 dias, não apresentou modificações significativas nos sistemas fisiológicos e endócrinos dos mesmos, como também não houveram mortes no decorrer constatando que a tolerância à salinidade do salmão do atlântico foi afetada (NIEVER-PUIGDOLLER et al.

2007). Por outro lado, já para salmões juvenis do Pacífico a hexazinona mostrou-se ligeiramente tóxica, com CL 50 (96h) entre 236-317 mg/L (WAN et al. 1988).

A Velpar K® WG, mistura comercial de diuron e hexazinona, causou em embriões de peixe paulistinha (*Danio rerio*) edemas, atraso no desenvolvimento, absorção do saco vitelínico e deformidade da cauda, com CL50-96h de 37,45 mg/L. Já em peixes adultos a CL50-96h foi de 50,41 mg/L. Esses animais também mostraram alterações comportamentais como natação errática, perda de equilíbrio, períodos de paralisia e permanência dos peixes no fundo dos aquários (TESOLIN et al. 2014).

Franco-Bernardes et al. (2015) também testou Velpar K® WG em animais adultos de ambos os sexos da espécie tilápia do Nilo, animais relativamente resistentes, tendo como resultado a indução de etoxiresorufina-O-desetilase (EROD), que determina a atividade catalítica, e dano genotóxico. Esses resultados indicam que Velpar K® WG pode ser tóxico para organismos aquáticos, sendo animais menores mais suscetíveis a biomarcadores químicos e os maiores mais suscetíveis a danos genotóxicos (FRANCO-BERNARDES et al. 2015).

SOUZA-FILHO et al. (2011) constataram que animais expostos a um herbicida a base de glifosato (R. Transorb), um dos mais utilizados no mundo para prevenção de ervas daninhas, é tóxico em exposição aguda nas seguintes concentrações 2, 4, 8, 16 e 32 µl/L, para o peixe *Poecilia reticulata*. Este herbicida causou alterações comportamentais, promovidas pela ação do herbicida no sistema nervoso e branquial.

Canabarro e Toledo (2010) avaliaram o estresse oxidativo em fígados de peixes *Oreochromis niloticus* submetidos a diferentes tipos de ambientes artificiais, com peixes coletados na bacia do Rio Piragibu-Mirim (Sorocaba/SP), ambiente de represa com fluxo de água corrente, outra coleta em Lago do Paço, com amostras de peixes de ambientes artificiais com pouco fluxo de água e em outro ponto pesqueiro Maeda, com pouco fluxo de água, onde a água sai de um lago para o outro. Os resultados indicaram que ocorreu uma queda nos níveis de MDA (Malondialdeído) nos grupos Maeda e Paço, e nos níveis de GST (Glutathione S-transferase), enzima antioxidante, sinalizando que o fígado pode ter suas defesas antioxidantes comprometidas.

O herbicida atrazina causou à redução no conteúdo hepático de MDA (Malondialdeído) quando comparados aos grupos controle, e a concentrações de 2 µg/L e 10 µg/L reduziu significativamente as atividades hepáticas das enzimas antioxidante SOD e CAT em relação

ao grupo controle, demonstrando não ser uma concentração segura para a espécie *Prochilodus lineatus* (SANTOS, 2010).

3 Material e métodos

3.1 Químico

Herbicida Hexazinona ($C_{12}H_{20}N_4O_2$) (3-Cyclohexyl-6-dimethylamino-1-methyl-1,3,5-triazine- 2,4(1H, 3H)-dione).

3.2 Animais e desenho experimental

Foram utilizados no total 108 peixes juvenis da espécie *Oreochromis niloticus* (Tilápia do Nílo) ($2,6 \pm 0,3$ g peso corporal), adquiridos no Núcleo de Piscicultura da Universidade Federal de Alagoas e transportados para o Laboratório de Aquicultura do Centro de Ciências Agrárias (CECA-UFAL), onde o experimento foi realizado. Os peixes passaram por duas etapas de aclimação, a primeira foi em tanque de recepção com recirculação de água com biofiltro e aeração constante. Após uma semana os peixes foram alocados em aquários de vidro (20L) durante 8 dias com controle de temperatura ($26 \pm 1^\circ C$), e fotoperíodo 12h dia/12h noite. Os animais foram alimentados 3 vezes ao dia com ração comercial e os parâmetros de qualidade da água monitorados através do teste colorimétrico.

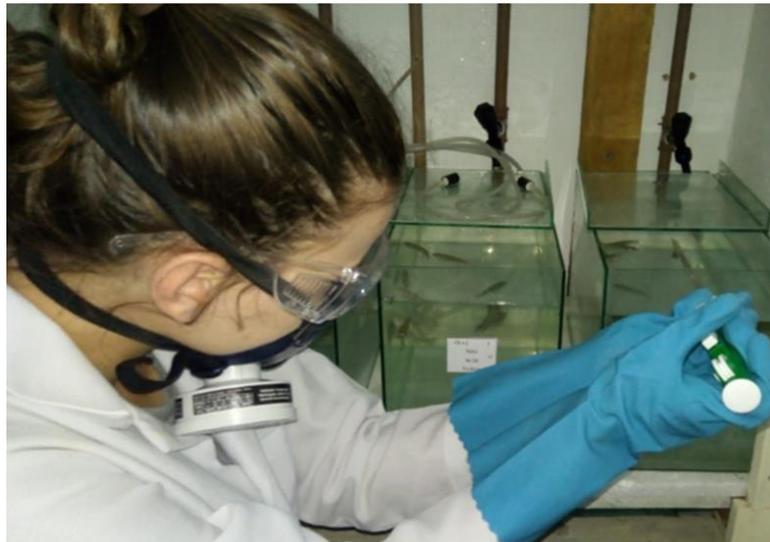
Após período de aclimação, os peixes foram submetidos a ensaios toxicológicos da formulação comercial da Hexazinona (HZN). O experimento foi realizado com 18 aquários com capacidade de 20L cada (Figura 2), sendo 6 animais por aquário distribuídos de forma aleatória em seis tratamentos, com três repetições cada. Os aquários foram distribuídos da seguinte forma: 0,0 mg/L, HZN1 que continha 8,8 mg/L de hexazinona, HZN2 continha 17,6 mg/L e hexazinona, HZN3 com 35,2 mg/L, HZN4 com 70,4 mg/L e HZN5 140,8 mg/L (Figura 3). Durante todo o experimento foi observado o comportamento e coloração dos peixes expostos ao herbicida.

Figura 2 – Aquários experimentais



Aquários utilizados para a realização do experimento, distribuídos de forma aleatória e identificados de acordo com o tratamento.

Figura 3 – Contaminação dos aquários



Aplicação do herbicida hexazinona nos aquários de acordo com as concentrações.

Após 96h de exposição os indivíduos foram eutanasiados utilizando 100 mg/L do anestésico MS-222 (metanosulfonato de triclaína) e o sangue retirado com seringa contendo EDTA 10% (ácido etilenodiamino tetra-acético), para as análises de genotoxicidade (Figura 4). Para análise da capacidade antioxidante foi coletada toda a brânquia de três animais por aquário tendo o excesso de sangue lavado com solução salina gelada (0,9%), e em seguida congelados em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80 °C.

Figura 4 – Coleta sanguínea



Coleta de sangue periférico em seringa contendo EDTA 10%.

3.3 Micronúcleo

Para o teste de micronúcleo foram preparadas duas lâminas por tratamento com 20 μ L da solução de sangue periférico / EDTA 10% por esfregaço em lâmina histológica. Após secagem a temperatura ambiente e fixação em etanol absoluto (10 minutos) as lâminas foram coradas. A coloração foi feita com o conjunto de corantes KIT INSTANT PROV seguindo protocolo padrão do kit. Os micronúcleos foram identificados utilizando microscópio óptico (Nikon eclipse 50i) (ampliação de 1000X, imersão em óleo), e pontuado a frequência de eritrócitos micronucleados (MNE). Corpos de cromatina não refrativos, circulares ou ovóides, menores do que um terço do núcleo principal e apresentando o mesmo padrão de coloração e de focalização como o núcleo principal, foi classificado como micronúcleo (AL-SABTI e MELCALFE, 1995).

A porcentagem de micronúcleos foi obtida através da fórmula abaixo:

$$\%MN = (\text{Número de células contendo micronúcleo} / \text{Número total de células contadas}) \times 100$$

3.4 Análise da capacidade antioxidante

3.4.1 Preparo das amostras

As brânquias inteiras dos peixes foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio (pH 7.4) 0,2 M e em seguida centrifugadas (14000 rpm, 4°C 10 minutos). O sobrenadante resultante foi utilizado para as seguintes análises: superóxido dismutase (SOD), catalase

(CAT), glutathione S-transferase (GST) e do produto da peroxidação lipídica o Malondialdeído (MDA), que foram realizadas em espectrofotômetro.

3.4.2 Atividade das enzimas antioxidantes

A atividade da SOD foi mensurada nas brânquias de acordo com Dieterich et al. (2000), baseado na capacidade desta enzima catalisar a reação do superóxido O_2^- e o peróxido de hidrogênio. Para a mensuração da absorvância ($\lambda = 570\text{nm}$) da superóxido dismutase (SOD) foram utilizados as seguintes soluções: MTT ((3-(4, 5-dimethylthiazolyl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) (1,25 mM), Ácido Pirogálico (100 μM) e tampão fosfato 0.2 M pH 7,0 que foram adicionados à amostra em microtubos e levados para estufa à 37°C por 10 minutos. Passado o tempo as amostras foram retiradas e foi adicionado o reagente Dimetilsulfóxido (DMSO). As amostras foram então lidas em cubeta de quartzo em espectrofotômetro, onde as médias de cada tratamento foi dividida pela média do padrão e o resultado multiplicado pelo fator de diluição. Os resultados foram expressos em SOD U/g tecido.

A atividade CAT foi mensurada segundo Aebi (1984), através da taxa da queda da absorvância em 60 segundos do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (10 mM) diluído em tampão fosfato de potássio 0.2 M (pH 7.0). A mensuração foi realizada em espectrofotômetro ($\lambda = 240\text{nm}$). O coeficiente de extinção molar do peróxido de hidrogênio ($\epsilon_{240} = 36 \text{ mol/L/cm}$) foi utilizado para os cálculos e seu resultado foi multiplicado pelo fator de diluição. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/min/g}$ tecido.

A atividade da enzima GST foi realizada de acordo com Habig et al. (1974), através do aumento da absorvância ($\lambda = 340 \text{ nm}$) do conjugado glutathione-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) durante 60 segundos. Foi utilizado tampão A (0,1 M) pH 7,0, CDNB (0,1 M) e L-glutathione redutase (GSH) (100 mM). O coeficiente de extinção molar do CDNB $\epsilon_{340} = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ foi utilizado para os cálculos. Os resultados foram expressos como $\mu\text{mol/min/g}$ tecido.

3.4.3 Determinação do malondialdeído

A determinação de malondialdeído (MDA) realizou-se de acordo com Buege e Aust (1978). As amostras foram pipetadas em microcubos, sendo 300 μL de amostra e 600 μL de solução TBARS (ácido tricloroacético (15%) / ácido tiobarbitúrico (0,375%) / ácido clorídrico (0,6%)), permanecendo em banho maria a 90°C por 40 minutos. Em seguida as amostras

foram resfriadas em gelo por 5 minutos, posteriormente foram centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos à 18°C. A leitura ($\lambda = 535$ nm) foi realizada em espectrofotômetro utilizando cubeta de quartzo. Os níveis totais de MDA em cada amostra foram determinados por meio de curva padrão a partir de concentrações conhecidas de 1,1,3,3-tetramethoxypropane (TMPO) e os resultados expressos em $\mu\text{M}/\text{g}$ tecido.

3.5 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Graphpad Prism (versão 6.0, Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média e avaliados pela análise de variância unidirecional (ANOVA) seguido do test *t*. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas em $P \leq 0,05$.

4 Resultados e discussão

4.1 Resultados

No momento em que se realizou a contaminação dos aquários com o herbicida hexazinona os animais apresentaram as seguintes mudanças comportamentais: no tratamento controle, os animais apresentaram natação perfeita e coordenada, nas demais concentrações os peixes estavam agitados e ocorreu escurecimento da superfície corporal, quanto maior a concentração maior a mudança de coloração (Figuras 5 e 6). Nas concentrações maiores 35,2 mg/L (HZN3) 70,4 mg/L (HZN4) e 140,8 mg/L (HZN5) os animais se mantiveram no fundo do aquário, subindo a todo momento à superfície e nadando de forma desordenada.

Figura 5 – Peixe tratamento controle



Peixe tratamento controle apresentando características corporais superficiais normais.

Figura 6 – Peixe HZN5 140,8 mg/L



Peixe HZN5 apresentando superfície corporal escurecida.

Ao término do experimento, os animais foram anestesiados para a coleta de sangue e dos órgãos. Neste momento foi possível observar que alguns animais dos tratamentos HZN2 8,8 mg/L, HZN3 17,6 mg/L e HZN5 140,8 mg/L de hexazinona apresentavam a base de suas nadadeiras vermelhas, o que indica hemorragia (Figura 7).

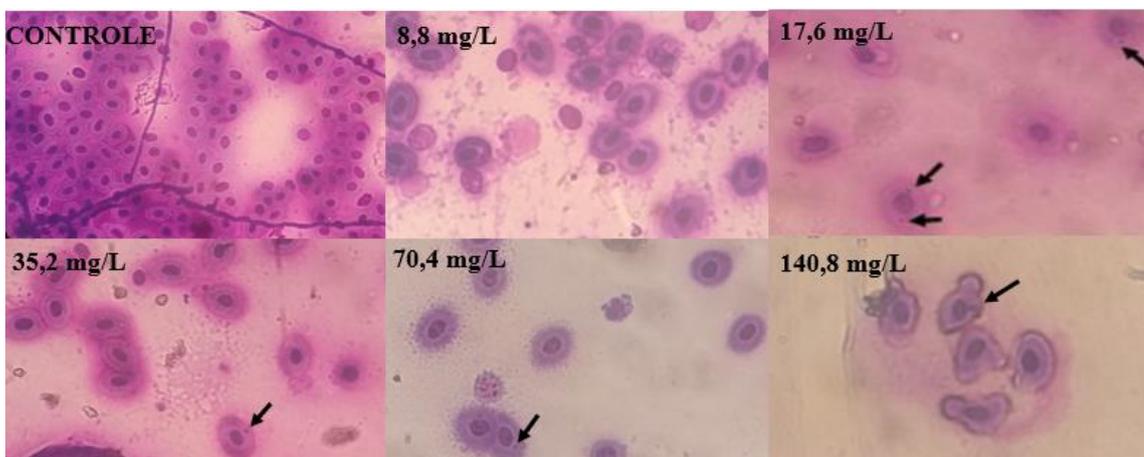
Figura 7 – Sinais de hemorragia



Peixe apresentando sinais de hemorragia na base da nadadeira. As setas presentes na imagem apontam o local da hemorragia.

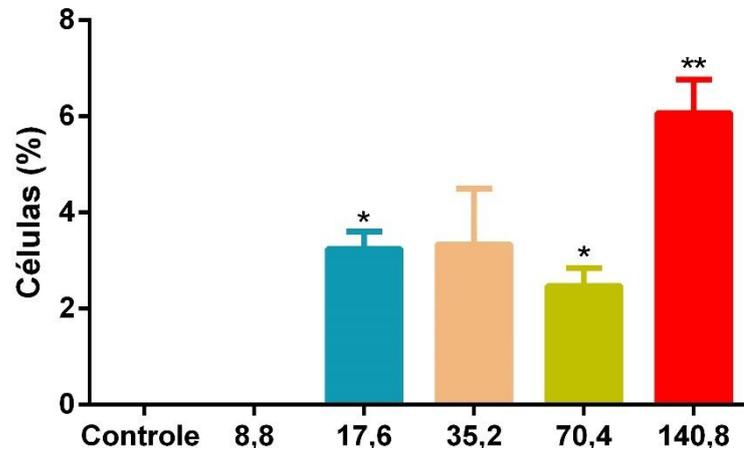
Observou-se a presença de micronúcleos em eritrócitos de *Oreochromis niloticus* nos tratamentos com as seguintes concentrações: 17,6 mg/L, 35,2 mg/L, 70,4 mg/L e 140,8 mg/L (Figura 8). Os animais que foram expostos a concentração de 140,8 mg/L apresentaram maior porcentagem de células micronucleadas ($P < 0,0001$) quando comparado com o tratamento controle (Figura 9).

Figura 8 – Eritrócitos micronucleados



Eritrócitos de *Oreochromis niloticus* apresentando micronúcleos nas concentrações 17,6, 35,2, 70,4 e 140,8 mg/L. As setas presentes na imagem apontam a localização dos micronúcleos nos eritrócitos.

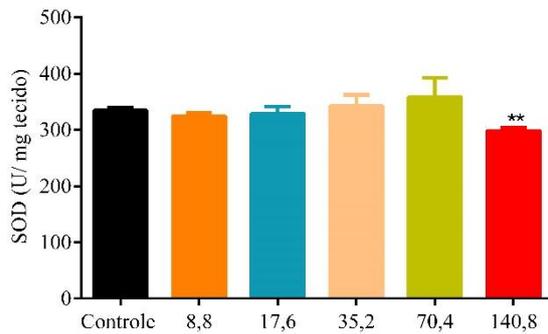
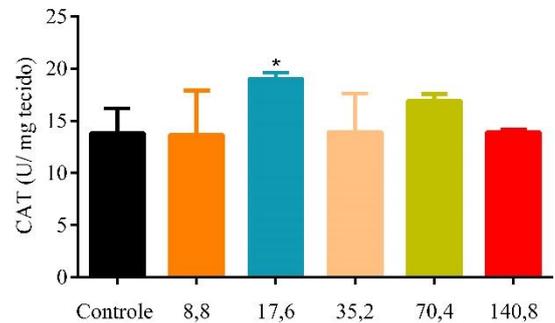
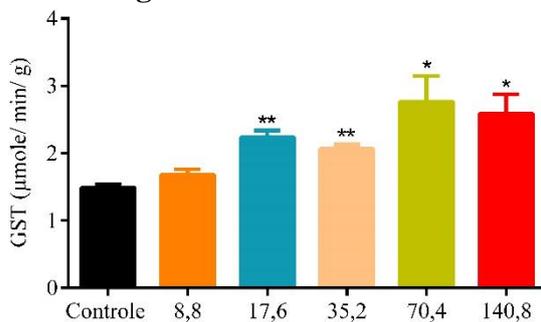
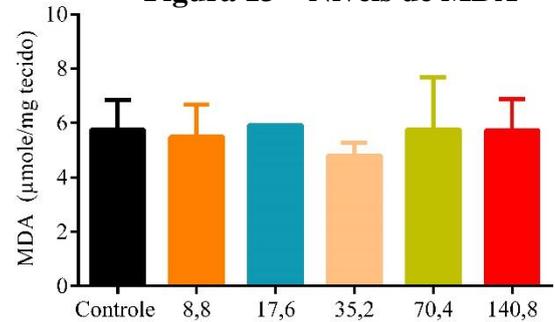
Figura 9 – Porcentagem de eritrócitos micronucleados



Porcentagem de micronúcleos em células de *Oreochromis niloticus*.
 * diferença significativa a nível de 1% de probabilidade e ** a 5% de probabilidade em relação ao tratamento controle.

A atividade da enzima SOD nas brânquias, mostrou redução no grupo de peixes expostos a 140,8 mg/L ($P = 0,005$) de hexazinona em relação ao controle (Figura 10).

A CAT aumentou ($P = 0,02$) nos peixes expostos à 17,6 mg/L em relação ao controle (Figura 11). A atividade da enzima GST aumentou nas concentrações: 17,6 ($P = 0,003$), 35,2 ($P = 0,002$), 70,4 ($P = 0,03$) e 140,8 mg/L ($P = 0,02$) quando comparado com o tratamento controle (Figura 12). O MDA, produto da peroxidação lipídica, não apresentou diferença entre as brânquias dos animais em nenhuma das concentrações testadas (Figura 13).

Figura 10 – Atividade da SOD**Figura 11 – Atividade da CAT****Figura 12 – Atividade da GST****Figura 13 – Níveis de MDA**

Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutiona S-transferase (GST) e níveis do produto da peroxidação lipídica o malondialdeído (MDA) em brânquias de *O. niloticus* expostos as concentrações 0, 8,8, 17,6, 35,2, 70,4 e 140,8 mg/L. * diferença significativa a nível de 1% de probabilidade e ** a 5% de probabilidade em relação ao tratamento controle.

4.2 Discussão

Durante o experimento (96h) não houveram mortes, indicando que o herbicida hexazinona se utilizada até a concentração de 140,8 mg/L não causará morte em *Oreochromis niloticus*. Tal fato pode ser devido à alta rusticidade e adaptabilidade ecológica da tilápia do Nilo (TREWAVAS, 1983; WELCOMME, 1988). O mesmo herbicida também apresentou baixa toxicidade a concentração de 100 µg/L para salmão do atlântico, não ocasionando mortes no decorrer de 21 dias em um experimento realizado por Nieves-Puigdoller K. et al. (2007).

Em relação ao comportamento agitado e o escurecimento superficial, o mesmo foi observado por Botelho et al. (2009) em alevinos de tilápia do Nilo submetidos a teste agudo de toxicidade com o herbicida atrazina. As reações que ocorrem em tecidos animais para que haja a produção de energia pode explicar esse escurecimento, uma vez que são formados radicais livres instáveis que atacam outras moléculas e aceleram a oxidação de tecidos.

Se tratando de danos no DNA, foi possível observar uma maior frequência de eritrócitos micronucleados no tratamento de maior concentração, 140,8 mg/L. O mesmo foi observado por Ventura et al. (2008) e Nwani et al. (2011), utilizando a formulação comercial do herbicida atrazina, eles perceberam efeitos genotóxicos e mutagênicos em *O. niloticus* devido ao aumento do número de células micronucleadas, que acarreta em prejuízo para o desenvolvimento e a reprodução desses animais. Este resultado demonstra que o herbicida hexazinona é capaz de causar danos ao material genético de tilápia do Nilo, o que pode indicar atraso na divisão cromossômica.

Quanto às enzimas antioxidante, houve uma redução na atividade da SOD nas brânquias do grupo exposto à 140,8 mg/L de hexazinona em relação ao tratamento controle. É comum a atividade da SOD aumentar em peixes que vivem em locais poluídos, uma vez que há o aumento do radical superóxido (O_2^-) no meio exigindo a ação da enzima. A redução da atividade dessa enzima, pode ser explicada devido ao fato do excesso de radicais superóxido ou o peróxido de hidrogênio serem capazes de oxidar a cisteína da enzima diminuindo a sua atividade (VAN DER OOST et al. 2003).

É de se esperar que em situações de exposição a herbicidas causem uma maior indução do sistema antioxidante, uma vez que são capazes de aumentar os níveis de espécies reativas. A CAT tem sido considerada uma boa forma de avaliar se está ocorrendo o estresse oxidativo (VAN DER OOST et al. 2003). O aumento da atividade dessa enzima é interpretado com uma defesa do organismo na tentativa de eliminar as espécies reativas de oxigênio. No presente trabalho, a CAT apresentou um aumento significativo no tratamento de concentração 17,6 mg/L em comparação ao grupo controle em brânquias de *O. niloticus*. Niogy et al. (2002) estudando a glândula digestiva de Oyster (*Saccostrea cucullata*) também verificou um aumento da CAT em populações que vivem em ambientes poluídos em comparação à região não poluída em diferentes estações do ano. Clasen (2009), observou um aumento dessa enzima no fígado de carpas expostas por 30 dias ao inseticida carbofuran, no entanto o mesmo autor observou que as carpas quando expostas a fiopronil a enzima CAT diminuiu no tecido hepático. O aumento da CAT à concentração de 17,6 mg/L pode ser reflexo da resposta adaptativa do órgão à uma alta produção de peróxido de hidrogênio a fim de evitar danos celulares pelo aumento da síntese de H_2O_2 causada pelo herbicida hexazinona.

A redução apresentada da enzima SOD foi proveniente da alta concentração de H_2O_2 , confirmada pelo aumento da CAT. De acordo com Hodgson e Fridovich (1973), esse fato

ocorre devido ao cobre que se encontra ligado à histidina no sítio ativo da enzima que ao entrar em contato com o H_2O_2 tem seu estado alternado durante seu ciclo catalítico.

Em relação ao biomarcador de fase II da biotransformação, pode-se observar aumento da atividade da GST nas brânquias de tilápia do Nilo nas concentrações 17,6, 35,2, 70,4 e 140,8 mg/L. Esse resultado se equipara ao encontrado por Almeida et al. (2005), onde foi observado um aumento significativo da GST em peixes expostos ao sedimento coletado em locais poluídos e também em peixes mantidos em locais impactados em relação à animais que viviam em locais de referência (CAMARGO e MARTINEZ, 2006). Esse aumento da GST implica em um aumento na metabolização da hexazinona (GALLAGHER et al. 2001), indicando uma maior capacidade de detoxificação frente a condições fisiológicas oxidantes nas brânquias ocasionada pelo herbicida hexazinona, assim fornecendo proteção contra o estresse oxidativo.

Os níveis de MDA não evidenciaram peroxidação lipídica nas brânquias dos peixes expostos ao herbicida hexazinona. O nível de peroxidação lipídica pode variar em diferentes espécies de peixes, como observado por Ahmad et al. (2000), que constatou em seu estudo diferenças entre a peroxidação de animais de água salgada e doce. A ausência da peroxidação lipídica em Tilápias do Nilo expostas ao herbicida hexazinona pode ser explicada pelo aumento da enzima GST, que forneceu proteção antioxidante.

Os herbicidas são bastante benéficos à produção, evitando perdas. No entanto, vêm crescendo a problemática de seu uso, devido aos efeitos potenciais da exposição repetitiva a baixos níveis, e da sensibilidade diferenciada de animais em relação à idade, sexo ou tamanho (FREEMARK e BOUTIN, 1995).

5 Conclusão

Este trabalho demonstrou que concentrações subletais do herbicida hexazinona são capazes de causar danos ao DNA e estresse oxidativo nas brânquias de tilápia do Nilo.

Referências bibliográficas

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymology**, v. 105, p. 121–126, 1984.

AGRIC. **Produção de Cana-de-açúcar**. 2011. Disponível em: <
http://www.agric.com.br/producoes/cultivo_da_cana.html >. Acesso em: 07 de jun. de 2018.

AGOSTINI, J. M. S. O teste micronúcleo: seu uso no homem. **Biotemas**, v. 6, n. 2, p. 1-19, 1993.

AHMAD, I. et al. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1523, n. 1, p. 37-48, september 2000.

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

AL-SABTI K.; MERCALFE C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 343(2-3): p. 121-135, june 1995.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Cartilha sobre agrotóxicos, série trilhas do campo**. P. 1-23, 2011.

ARIAS, A. R. L. et al. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 61-72, 2007. ISSN 1413-8123.

BARBOSA, K. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010. ISSN 1415-5273.

BARLING, D. et al. A glutathione S-transferase with glutathione peroxidase activity from *Arabidopsis thaliana*: molecular cloning and functional characterization. **European Journal of Biochemistry**, v. 216, p. 579-86, 1993.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre gerações de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006. ISSN 0100-4042.

BOTELHO, R. G. et al. Toxicidade aguda de herbicidas a tilápia (*Oreochromis niloticus*). **Planta daninha**, Viçosa-MG, v. 27, n. 3, p. 621-626, 2009. ISSN 0100-8358.

CABI, 2013. **Invasive Species Compendium**. 2013. Disponível em:
<https://www.cabi.org/isc/datasheet/72086#3DF14617-F23D-42D9-AE36-8D50A6A27320>.
Acesso em: 14 de jul. de 2018.

- CAMARGO, M. M. P.; MARTINEZ, C. B. R. Biochemical and physiological biomarkers in *Prochilodus lineatus* submitted to in situ tests in an urban stream in southern Brazil. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 21, p. 61-69, 2006.
- CANABARRO, L.; TOLEDO, M. T. Estudo do estresse oxidativo em fígado de peixes *Oreochromis niloticus* capturados em ambientes artificiais na região de Sorocaba SP. **Revista Eletrônica de Biologia – REB**, v. 1, p. 31-57, 2010. Disponível em: <<https://revistas.pucsp.br/index.php/reb/article/view/1570/2505>>. Acesso em: 04 de jul de 2018.
- CASTAGNOLLI, N. **Criação de peixes de água doce**. Jaboticabal: FUNEP, p. 189, 1992.
- CLASEN, B. E. Oxidative stress biomarkers in carp (*Cyprinus carpio*) exposed to carbofuran and fipronil insecticides in rice field conditions. 2009, p. 80. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.
- COLE, D. Detoxification and activation of agrochemicals in plants. **Pesticide Science**, v. 42, p. 209-222, 1994.
- FLORA, S.; IZZOTTI, A. Mutagenesis and cardiovascular disease: Molecular mechanisms, risk factors, and protective factors. **Mutation Research**. v. 621 (1-2): p. 5-17, august 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2006.12.008>>. Acesso em: 10 ago 2018.
- DIETERICH, S. et al. Gene Expression of Antioxidative Enzymes in the Human Heart: Increased Expression of Catalase in the End-Stage Failing Heart. **Circulation**, v. 101, n 1, p. 33–39, 2000.
- DUDLER, R. et al. A pathogen-induced wheat gene encodes a protein homologous to glutathione S-transferases. **Molecular Plant-Microbe Interactions**., v. 4, p. 14-18, 1991.
- EMBRAPA. **Como funcionam os herbicidas: da biologia à aplicação** / Editado por Erivelton Scherer Roman, Leandro Vargas. Passo Fundo: Gráfica Editora Berthier, p. 5-8, 2005.
<https://www.embrapa.br/documents/1355291/12492345/Como+funcionam+os+herbicidas/954b0416-031d-4764-a703-14d9b28b178e?version=1.0>
- FAO, 2010. **Introduced Species Fact Sheets. Fisheries and Aquaculture Department**. Rome, Italy: FAO. <http://www.fao.org/fishery/introsp/9144/en>.
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista de Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.
- FREEMARK, K. e BOUTIN, C. Impacts of agricultural herbicide use on terrestrial wildlife in temperate landscapes: A review with special reference to North America: **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 52, n. 2-3, p. 67-91, 1995.

- FRANCO-BERNARDES, M.F. et al. The use of biomarkers to study the effects of the mixture of diuron and hexazinone on small and large *O. niloticus*. **Ecotoxicology Environmental Contaminants**, v.10, n. 1, p. 83-92, São José do Rio Preto, SP, 2015. Disponível em: <https://siaiap32.univali.br/seer/index.php/eec/article/view/6883/4766>. Acesso em: 11 de jun. de 2018.
- GALLAGHER, E. P.; GROSS, T. S.; SHEEHY, K. M. Decreased glutathione S-transferase expression and activity and altered sex steroids in lake Apopka brown bullheads (*Ameiurus nebulosus*). **Aquatic Toxicology**, v. 55, p. 223-237, 2001.
- GISH, T. G.; SHIRMOHAMMADI, A.; WIENHOLD, B. J. Field-scale mobility and persistence of commercial and starch-encapsulated atrazine and alachlor. **Journal of Environmental**, v. 23, n. 2, p. 355-359, March 1994. Disponível em: < doi:10.2134/jeq1994.00472425002300020021x>. >. Acesso em: 20 ago. 2018.
- HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JABOKY, W. B. Glutathione S-Transferases The first enzymatic step in mercapturic acid formation*. **The journal of biological chemistry** Vol. 249, No. 22, p. 7130-7139, 1974 Print& in U.S.A.
- HALLIWELL, B.; CLEMENT, M. V.; LONG, L. H. Hydrogen peroxide in the human body. **Febs Letters**, v. 486, n. 1, p. 10-13, december 2000. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)02197-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)02197-9)>. Acesso em: 10 ago. 2018.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. Ed. 2, Oxford: Clarendon Press; 1989.
- HODGSON, W. K.; FRIDOVICH, I. Reversal of superoxide dismutase reaction. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 54, p. 5299-5303, 1975.
- IARC - Internation Agency for Research on Cancer Monographs Volume 112: **evaluation of five organophosphate insecticides and herbicides**. 2015. Disponível em: < <https://monographs.iarc.fr/iarc-monographs-on-the-evaluation-of-carcinogenic-risks-to-humans-4/>> Acesso em: 15 nov. de 2018.
- KUVA, M. A. et al. Períodos de interferência das plantas daninhas na cultura da cana-de-açúcar. III - Capim-braquiária (*Brachiaria decumbens*) e capim-colonião (*Brachiaria decumbens*). **Planta Daninha**, v. 21, n. 1, p. 37-44, 2003.
- KREUZ, K.; TOMMASINI, R.; MARTINOIA, E. Old enzymes for a new job. Herbicide detoxification in plants. **Plant Physiology**, v. 111, p. 349-53, 1996.
- LÈVEQUE, C. Out of Africa: The success story of tilapias. **Environmental Biology of Fishes**, vol. 64, n. 4, p. 461-464, 2002.
- LEWIS et al. Herbicides: A new threat to the Great Barrier Reef. ELSEVIER. **Environmental Pollution** n. 157, p. 2470–2484, Australia, august/september 2009. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.03.006>>. Acesso em: 16 ago. 2018.

MACHADO, L. P. et al. Lesão oxidativa eritrocitária e mecanismos antioxidantes de interesse em Medicina Veterinária. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 8, n. 1, p. 84-94, Abril 2009.

MATSUMOTO, F. E. e CÓLUS, I. M. S. Micronucleus frequencies in *Astyanax bimaculatus* (Characide) treated with cyclophosphamide or vinblastine sulfat. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 2, p. 489-492, June 2000. ISSN 1415-4757. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572000000200041>>. Acesso em: 03 set. 2018.

MONQUERO, P.A. et al. Lixiviação de clomazone + ametryn, diuron + hexazinone e isoxaflutole em dois tipos de solo. **Planta Daninha**, v. 26, n. 3, p. 685-691, Viçosa-MG, 2008. ISSN 0100-8358. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83582008000300025>>. Acesso em: 29 ago. 2018.

MOREIRA, A.B., MANCINI-FILHO, J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. **Revista de Nutrição**, v.17(4), p. 411-424, outubro/dezembro 2004. ISSN 1415-5273. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-52732004000400002>, Acesso em: 2 ago. 2018.

NIEVES-PUIGDOLLER, K.; BJORNSSON, K. T., MCCORMICK, S. D. Effects of hexazinone and atrazine on the physiology and endocrinology of smolt development in Atlantic salmon. **Aquatic Toxicology**, n. 84, p. 27–37, May 2007.

NIYOGI, S. et al. Antioxidant enzymes in brackishwater oyster, *Saccostrea cucullata* as potencial biomarker of polyaromatic hydrocarbon pollution in Hooghly Estuary (India): seasonality and its consequences. **Science of the Total Environment**, v.281, n.1/3, p. 237-246, January 2002.

NOVA CANA. **Uso de pesticidas e herbicidas no cultivo da cana**. 04 de Fevereiro de 2013. Disponível em: <https://www.novacana.com/cana-de-acucar/uso-pesticidas-herbicidas-cultivo/>. Acesso em: 07 de jun. de 2018.

NUNES, M. E. M. **Utilização de peixes do gênero *Astyanax sp* como bioindicadores de contaminação ambiental no rio santa maria, Rosário do Sul – rs**. 2013, p. 11-35. Dissertação (Bacharel em Biotecnologia) Universidade Federal do Pampa. [Prof. Jeferson Luis Franco]. 2013.

NWANI, C.D. et al. Mutagenic and genotoxic assessment of atrazine-based herbicide to freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus test and single cell gel electrophoresis. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 3, n. 1. p. 314–322, March 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.etap.2010.12.001>>. Acesso em: 25 set. 2018.

OGA, S.; CAMARGO; M. M.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos da Toxicologia**. 3. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2008.

- OLIVEIRA JR. R. S. et al. (Eds.), **Biologia e Manejo de Plantas Daninhas, Mecanismos de ação de herbicidas**. cp. 7, p. 142-192, 2011.
- OLIVEIRA JR., R. S.; KOSKINEN, W. C.; FERREIRA, F. A. Sorption and leaching potential of herbicides on Brazilian soils. **Weed Research.**, v. 41, p. 97-111, 2001.
- OLIVEIRA, M. F. Comportamento de herbicidas no ambiente. In: OLIVEIRA JR., R. S.; CONSTANTIN, J. **Plantas daninhas e seu manejo**. Guaíba: Agropecuária, p. 315-362p. 2001.
- OLIVEIRA, M. C. de; SCHOFFEN, J. P. F. Oxidative stress action in cellular aging. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 6, p. 1333-1342, 2010.
- OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development – **OECD GUIDELINE** > <http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948442.pdf> > Acesso em: 23 de jun de 2018.
- PARAHYBA, R. B. V. Solos do município de Maceió-AL. **Manejo de conservação do solo e da água no contexto das mudanças ambientais**. Rio de Janeiro, 2008.
- PEIXEBR. Associação brasileira da piscicultura. **Anuário PeixeBR da Piscicultura 2018**.
- PLAA, G.L. Present status toxic substances in the environment. **Canadian Journal of physiology and Pharmacology**, v. 60, p. 1010-1016, 1982.
- PRATA, F. et al. Degradação e sorção de ametrina em dois solos com aplicação de vinhaça. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 7, p. 975-981, Julho 2001. ISSN 0100-204X. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2001000700007>. Acesso em: 26 set. 2018.
- RODRIGUES, A. C. F. 2014. **Estudo de variações bioquímicas e genotoxicidade induzidas por misturas de contaminantes em tilápia (*Oreochromis niloticus*), como biomarcadores de contaminação ambiental**. 2014, p. 2-124. Dissertação (Doutorado em Genética) Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto.
- SANTOS, T. G. **biomarcadores bioquímicos e genéticos para detecção dos efeitos do herbicida atrazina no peixe neotroica *Prochilodus lineatus***. 2010, p. 10-60. Dissertação (Mestrado em ciências biológicas) Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- SCHVARTSMAN. S. **Intoxicações agudas**. 4. ed. São Paulo: Editora Sarvier, 1991.
- SRIKANTH, K. et al. Glutathione and its dependent enzymes' modulatory responses to toxic metals and metalloids in fish-a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, p. 2133–2149, January 2013. ISSN 0944-1344.
- SOUZA FILHO, J. **Efeitos tóxicos e genotóxicos do herbicida round transorb em guppy (*Poecilia reticulata*) submetido a tratamento agudo**. 2011, p. 18-176. Dissertação

(Mestrado em ciências biológicas) Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, Goiânia.

SURESH, V. **Tilapias. In: Aquaculture: farming aquatic animals and plants** [ed. by Lucas, J. S. \Southgate, P. C.]. Oxford, UK: Blackwell Publishing. 2003.

TESOLIN, G. A. S. et al. Avaliação da toxicidade de herbicidas usados em cana-de-açúcar para o Paulistinha (*Danio rerio*). **O mundo da Saúde**, 86-97P., São Paulo. 2014.

TERRA DA GENTE – **Fauna**. Tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). Disponível em: < <http://g1.globo.com/sp/campinas-regiao/terra-da-gente/fauna/noticia/2015/02/tilapia-do-nilo.html> > 2015. Acesso em: 09 de nov. de 2018.

TREWAVAS, E. **Tilapiine fishes of the genera Sarotherodon, Oreochromis and Danakilia**. London, UK: British Museum of Natural History, p. 583, 1983.

TU et al. The Nature Conservancy, **Weed Control Methods Handbook**. Hexazinone. p. 1-6, abril de 2001.

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

VENTURA, B. C.; de ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M.P. 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 p. 42-51. 2008. ISSN 00483575.

VERANI, J. R. **Controle populacional em cultivo intensivo consorciado entre tilápia-do-nilo *Oreochromis niloticus* (LINNAEUS, 1757) e o tucunaré comum, *Cichla ocellaris* (SCHNEIDER, 1801) – aspectos quantitativos**. 1980, p. 116. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais). Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais.

WAN, M. T.; WATTS, R. G.; MOUL, D. J. Evaluation of the acute toxicity to juvenile Pacific salmonids of hexazinone and its formulated products: Pronone 10G, VelparR L, and their carriers. Bull. **Environmental Contaminants Toxicology**, v. 41, p. 609-616, 1988.

WELCOMME, R. **International introductions of inland aquatic species**. FAO Fisheries Technical Paper, v. 294, p. 1-318.1988.

WISE, R. et al. The economic impact and appropriate management of selected invasive alien species on the African continent. **Global Invasive Species Programme**. 2007.

WAUCHOPE, R. D.; WILLIAMS, R. G.; MARTI, L. R. Runoff of sulfometurom-methyl and cyanazine from small plots: effects of formulation and grass cover. **Journal of Environmental Quality**, v. 19, n. 1, p. 119-125, 1990.