



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Ana Carolina Volpato Zanandrea

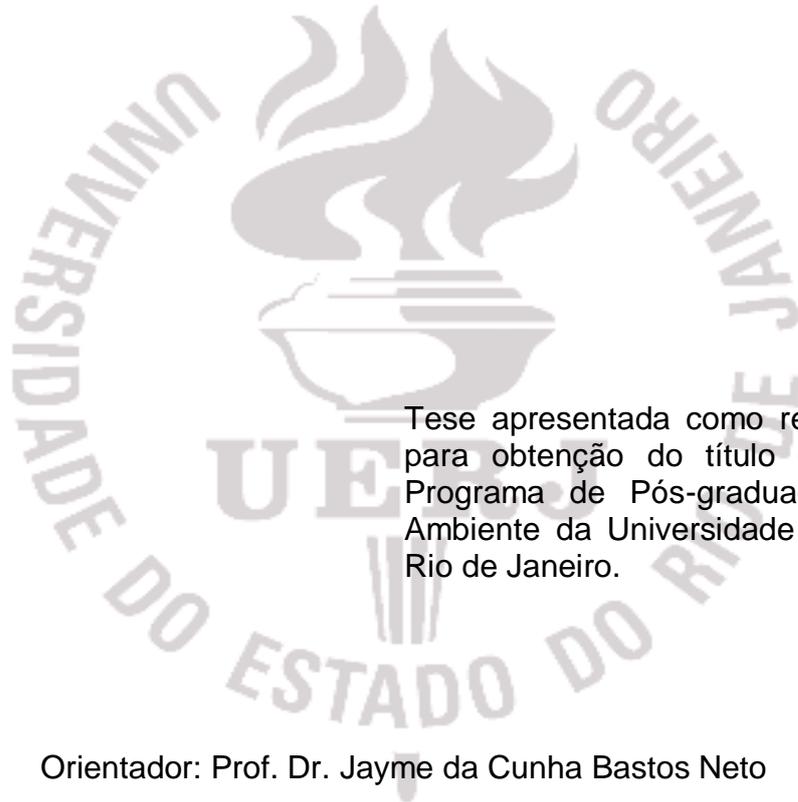
**Enzimas biomarcadoras e o efeito subletal de agrotóxicos no peixe
*Salminus brasiliensis***

Rio de Janeiro

2018

Ana Carolina Volpato Zanandrea

**Enzimas biomarcadoras e o efeito subletal de agrotóxicos no peixe
*Salminus brasiliensis***



Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor ao Programa de Pós-graduação em Meio Ambiente da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Jayme da Cunha Bastos Neto

Rio de Janeiro

2018

Ana Carolina Volpato Zanandrea

**Enzimas biomarcadoras e o efeito subletal de agrotóxicos no peixe *Salminus
brasiliensis***

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor ao Programa de Pós-graduação em Meio Ambiente da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 29 de novembro de 2018.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Jayme da Cunha Bastos Neto
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Israel Felzenszwalb
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Frederico Freire Bastos
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Evoy Zaniboni Filho
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Manildo Marcião de Oliveira
Instituto Federal Fluminense

Rio de Janeiro

2018

AGRADECIMENTOS

Ao meu professor orientador Dr. Jayme da Cunha Bastos, que me proporcionou novas possibilidades de aprendizado e aceitou me guiar na jornada do doutoramento. Muito obrigada pela sua dedicação para encarar este desafio comigo.

Aos professores do Laboratório de Bioquímica Toxicológica da UERJ, Dr.^a Vera Lúcia Freire da Cunha Bastos e Dr. Frederico Freire Bastos, pela atenção, palavras e ensinamentos compartilhados comigo.

Ao meu “veterano” Dr. Eduardo Santos Silva, o Dudu, pela paciência em me ensinar os protocolos de bancada e contínua troca de experiências.

Ao Lin Machado de Lima e ao Roosevelt (*in memoriam*), técnicos do Laboratório de Bioquímica Toxicológica da UERJ, e demais funcionários e colegas do departamento de Bioquímica da UERJ pela supervisão e ajuda.

Aos estagiários de Iniciação Científica Lauro, Marta, Júlia, Josivan, Karine e Rachel, que em algum momento auxiliaram na construção desta tese.

Ao Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce (LAPAD) da UFSC, especialmente ao prof. Dr. Evoy Zaniboni Filho, ao Maurício Machado e ao Dr. Giuliano Huergo, pela doação dos peixes e pelo suporte durante as coletas.

Ao LATOX da Friocruz, especialmente ao prof. Dr. Richard Hemmi Valente e a técnica Joelma Saldanha, pela ajuda com algumas análises.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

As secretárias Danielle e Jeniffer do programa de pós-graduação em Meio Ambiente (PPG-MA) da UERJ. Aos colegas de turma do PPG-MA 2014.1. Tive a oportunidade de conhecer pessoas incríveis e sempre dispostas a ajudar, com certeza o caminho foi mais fácil com a ajuda de vocês! Obrigada, Mariana Silva de Paula, Alessandra C. Pereira, Deivisson L. Cunha, Hudson Santos da Silva, Felipe M. Robledo, Deloar Oliveira, Érica Gaspar da Silva, Marciel Estevam e Daniel Cabral.

Meu maior e profundo agradecimento a minha família, que faz tudo ser possível. Aos meus pais, Elvira e Renato, meus primeiros mestres e eternos mentores. A meu marido Rodrigo Lobo, pelo amor, companheirismo e por me dar o mais belo presente que pode existir: nossa filha Laura!

Los científicos dicen que estamos hechos de átomos, pero a mí
un pajarito me contó que estamos hechos de historias.

Eduardo Galeano

RESUMO

ZANANDREA, A. C. V. *Enzimas biomarcadoras e o efeito subletal de agrotóxicos no peixe *Salminus brasiliensis**. 2018. 107 f. Tese (Doutorado em Meio Ambiente) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Alterações bioquímicas são interessantes ferramentas para verificar danos nos ecossistemas. As informações obtidas medindo atividades enzimáticas de animais podem alertar sobre a presença de xenobióticos e evitar alterações irreversíveis da biota. Efeitos subletais sobre peixes em águas contaminadas podem ser acompanhados pelas alterações das atividades de suas enzimas. Essas medições bioquímicas podem indicar mudanças causadas pela poluição e são, em geral, características de cada espécie. Com o objetivo de verificar se alterações de atividades enzimáticas no peixe dourado, *Salminus brasiliensis*, podem ser causadas por agrotóxicos, estabelecemos, primeiramente, os níveis normais de tais atividades. Dourados adultos de cultivo foram coletados no verão e no inverno para estabelecer as atividades basais de três enzimas usadas como biomarcadoras; as mono-oxigenases (P-450), a glutatona S-transferase (GST) e a carboxilesterase (CaE). Suas atividades foram ensaiadas em amostras de fígado. A CaE também foi ensaiada no soro dos peixes. Para ensaiar as mono-oxigenases testamos dois tipos de reação; a da ECOD – etoxicumarina O-desetilase e a da EROD – etoxirresorufina O-desetilase. A CaE foi ensaiada com o substrato 4-nitrofenilacetato e a GST foi ensaiada com o substrato CDNB. A ECOD mostrou ser mais adequada do que a EROD para medir a atividade de mono-oxigenase no fígado de dourado. Verificamos que as atividades de ECOD e CaE variavam sazonalmente no fígado. No verão, a atividade da CaE expressa por mg de proteína estava 2,4 vezes mais alta no soro do que no fígado. No inverno a atividade do fígado foi 1,9 vezes maior que no verão. Esta variação pode estar relacionada com as reservas metabólicas do peixe. Com isto inferimos que durante o inverno o dourado possa estar mais propenso a efeitos de xenobióticos que sofrem biotransformação catalisada por CaE do que no verão. Dourados foram submetidos a dois tratamentos: (i) inseticida triflumurom a 0,025 e a 0,1 ppm na água, (ii) um herbicida com glifosato a 1,5 ppm na água. Foram retiradas amostras de sangue e fígado depois de 4, 24 e 48 horas de exposição. Não foram verificadas, para todos os tempos, diferenças significativas entre as atividades enzimáticas ensaiadas no fígado dos peixes controles e daqueles expostos aos dois agrotóxicos, sugerindo que a atividade de P-450, GST e CaE em fígado não são biomarcadores eficazes para estes poluentes nas doses e tempos testados. Por outro lado, a atividade da CaE dobrou no soro de dourados expostos no inverno, indicando que a atividade da CaE do soro é um eficiente biomarcador de contato para o triflumurom e o glifosato. Ensaia atividade da CaE no soro de dourados é vantajoso por ser rápido e preciso, além de preservar a vida do animal.

Palavras-chave: Biomonitoramento. Carboxilesterase. ECOD. Triflumurom. Glifosato.

ABSTRACT

ZANANDREA, A. C. V. *Biomarker enzymes and the sublethal effect of pesticides on fish *Salminus brasiliensis**. 2018. 107 f. Tese (Doutorado em Meio Ambiente) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Biochemical changes are interesting tools for verifying damaging ecosystems imbalances. Information obtained from monitoring enzymatic activities of animals can alert to the presence of xenobiotics and prevent irreversible biota changes. Sublethal effects on fish in contaminated water may be accompanied by changes in the activities of their enzymes. These biochemical measurements can indicate changes caused by pollution and are, in general, characteristics of each species. In order to verify if alterations of enzymatic activities in the fish dorado, *Salminus brasiliensis*, can be caused by pesticides, we established, firstly, the normal levels of such activities. Adult farmed dorados were collected in the summer and winter to establish the basal activities of three enzymes used as biomarkers; monooxygenases (P-450), glutathione S-transferase (GST) and carboxylesterase (CaE). Their activities were assayed in liver samples. CaE was also assayed in fish serum. To assay the monooxygenases, two types of reaction were tested; ECOD – ethoxy coumarin O-deethylase and EROD – ethoxy resorufin O-deethylase. CaE was assayed with the substrate 4-nitrophenyl acetate and GST was assayed with the CDNB substrate. The ECOD showed to be more suitable than EROD to measure monooxygenases activity in dorado liver. We verified that the ECOD and CaE activities varied seasonally in the liver. For dorado, in summer, CaE activity expressed per mg protein was 2.4 times higher in serum than in liver. In winter, liver activity was 1.9 times higher than in summer. This variation may be related to fish metabolic reserves. Thus, we infer that during the winter the dorado may be more prone to the effects of xenobiotics that undergo biotransformation catalyzed by CaE than in the summer. Dorados were exposed to two treatments: (i) triflumurom insecticide at 0.025 and 0.1 ppm in water, (ii) herbicide glyphosate at 1.5 ppm in water. Blood and liver samples were taken after 4, 24 and 48 hours of exposure. No significant differences between the enzymatic activities of the control fish liver and those exposed to both pesticides were observed at all times, suggesting that the activities of P-450, GST and CaE in the liver are not effective biomarkers for these pollutants in the doses and times tested. However, CaE activity doubled in the serum of dorado exposed in the winter, indicating that serum CaE activity is an efficient contact biomarker for triflumurom and glyphosate in this species. Testing CaE activity in serum from dorado is advantageous because of its readiness and, above all, it preserves the animal's life.

Keywords: Biomonitoring. Carboxylesterase. ECOD. Triflumurom. Glyphosate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da sequência das respostas aos poluentes dentro de um sistema biológico.....	15
Figura 2 - Gráfico da comercialização anual de agrotóxicos e afins, por área plantada no Brasil entre 2000 e 2012.	19
Figura 3 - Fórmula estrutural plana do glifosato.	26
Figura 4 – Fórmula estrutural plana do triflumurom.....	29
Figura 5 - Reações do metabolismo dos xenobióticos.	34
Figura 6 - Esquema geral da toxicocinética dos xenobióticos.	37
Figura 7 - Ciclo catalítico do citocromo P-450.....	39
Figura 8 - Exemplar de dourado, <i>Salminus brasiliensis</i>	46
Figura 9 - Esquema da reação enzimática da ECOD e da EROD.	52
Figura 10 - Esquema do ensaio da atividade enzimática da carboxilesterase.	53
Figura 11 - Esquema do ensaio da atividade enzimática da GST.....	55
Figura 12 - Atividade sazonal do citocromo P-450 em fígado do dourado, <i>S. brasiliensis</i> , para desetilar etoxicumarina (ECOD).	61
Figura 13 - Variação das concentrações de 4-NFA sobre a velocidade inicial da atividade de CaE em soro do dourado, <i>S. brasiliensis</i>	63
Figura 14 - Atividade de CaE do dourado, <i>S. brasiliensis</i> , em duas formas de armazenamento do plasma e do soro (n = 6).....	64
Figura 15 – Comparação da atividade de CaE em soro do dourado, <i>S. brasiliensis</i> , 65	
Figura 16 - Variação das concentrações de 4-NFA sobre a velocidade inicial da atividade de CaE em microsossomos do fígado do dourado, <i>S. brasiliensis</i> , pela curva de Michaelis-Menten.	66
Figura 17 - Variação sazonal por mg de proteína da atividade de CaE em soro e fígado do dourado, <i>Salminus brasiliensis</i>	66
Figura 18 - Variação da atividade de GST na fração solúvel do fígado do dourado, <i>S. brasiliensis</i> , pela curva de Michaelis-Menten.	67
Figura 19- Atividade de GST sobre CDNB presente em fração solúvel de fígado do dourado, <i>S. brasiliensis</i>	67
Figura 20– Atividade de CYP na fração dos microsossomos do fígado do dourado, <i>S. brasiliensis</i> , após exposição na água de 0,1 ppm de triflumurom e 1,5 ppm de glifosato.....	69
Figura 21 - Atividade de GST na fração solúvel do dourado, <i>S. brasiliensis</i> , após exposição a agrotóxicos na água.	69
Figura 22- Atividade de CaE na fração dos microsossomos do fígado do dourado, <i>S. brasiliensis</i> , após exposição a agrotóxicos na água.....	70

Figura 23 – Atividade de CaE no soro do dourado, <i>S. brasiliensis</i> , após exposição aos agrotóxicos na água no experimento do inverno.	70
Figura 24 – Atividade de CaE no soro do dourado, <i>S. brasiliensis</i> , após exposição aos agrotóxicos na água no experimento do verão.	71
Figura 25 – Atividade de CaE sobre 4-NFA no soro do dourado, <i>S. brasiliensis</i> , com a presença de KCl no meio reacional.	72
Figura 26 – Atividade de CaE sobre 4-NFA no soro do dourado, <i>S. brasiliensis</i> , com a presença de eserina no meio reacional.	72
Figura 27 – Atividade residual de BChE em soro humano e atividade de CaE em soro de dourado, <i>S. brasiliensis</i> , com a presença de eserina no meio reacional.	73
Figura 28 - Atividade residual de CaE em soro de dourado, <i>S. brasiliensis</i> , com a presença de iso-OMPA no meio reacional.	74
Figura 29 - Atividade de CaE sobre 4-NFA no soro de dourado, <i>S. brasiliensis</i> , com a presença de EDTA no meio reacional.	74
Figura 30 - Atividade de CaE sobre 4-NFA no soro de dourado, <i>S. brasiliensis</i> , com a presença de glifosato no meio reacional.	75
Figura 31 - Atividade de CaE sobre 4-NFA no soro de dourado, <i>S. brasiliensis</i> , com a presença de triflumurom no meio reacional (Teste t, $P > 0,05$).	76
Figura 32 – Perfil cromatográfico na coluna HiTrap Blue.	76
Figura 33 – Perfil cromatográfico na coluna Sepharose 4B procainamida.	77
Figura 34 - Imagem do gel desnaturante (SDS-PAGE) de fração contendo CaE semipurificada do soro de dourado, <i>Salminus brasiliensis</i>	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Reações de biotransformação de xenobióticos verificadas neste estudo.	37
Tabela 2 - Protocolo para o ensaio de ECOD.	53
Tabela 3 - Características físico-químicas dos viveiros de terra.	60
Tabela 4 - Atividade média do citocromo P-450 em fígado do dourado, <i>S. brasiliensis</i> , para desetilizar etoxicumarina (ECOD) e etoxirresorufina (EROD).	60
Tabela 5 – Atividade sazonal do citocromo P-450 em fígado do dourado, <i>S. brasiliensis</i> , para desetilizar etoxicumarina (ECOD) e etoxirresorufina (EROD).	61
Tabela 6 - Atividade do citocromo P-450 em fígado de peixes para desetilizar etoxicumarina (ECOD) e etoxirresorufina (EROD).	62
Tabela 7 - Valores aparentes da K_M e da $V_{m\acute{a}x}$ de hidrólise de 4-NFA por <i>pool</i> de soro de peixes neotropicais.	63
Tabela 8 - Atividade sazonal de CaE do dourado, <i>S. Brasiliensis</i> .	65
Tabela 9 – Atividade de GST sobre CDNB em fração solúvel de fígados de peixes.	68
Tabela 10 - Atividades enzimáticas de esterases em soro de dourado, <i>Salminus brasiliensis</i> , após semipurificação.	77
Tabela 11 - Tabela do rendimento da semipurificação de carboxilesterase de soro de dourado, <i>Salminus brasiliensis</i> .	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADN Ácido Desoxirribonucleico

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AChE Acetilcolinesterase

BChE Butirilcolinesterase

BSA Albumina sérica bovina

CaE Carboxilesterase

CDNB 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno

ChO Colinesterases

CLAE Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês, HPLC)

DDT Diclorodifeniltricloroetano

ECOD O-desetilação da 7-etoxicumarina

EROD O-desetilação da 7-etoxirresorufina

ERO Espécies reativas de oxigênio

Fiocruz Fundação Oswaldo Cruz

GSH Glutathiona reduzida

GST Glutathiona S-transferase

HPA Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

IBAMA Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

LAPAD Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce

LATOX Laboratório de Toxinologia do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz)

NADPH Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida

4-NFA 4-nitrofenilacetato

ptn Proteína

UERJ Universidade do Estado do Rio de Janeiro

UFSC Universidade Federal de Santa Catarina

LISTA DE SÍMBOLOS

K_M constante de Michaelis-Menten

k_c constante de velocidade específica

L litro

M mol por litro

mg miligrama

min minutos

mL mililitro

mm milímetro

nm nanômetro

kDa quilodalton (unidade de massa atômica)

μg micrograma

μL microlitro

pH potencial hidrogeniônico

ppm partes por milhão

rpm rotações por minuto

$V_{\text{máx}}$ Velocidade máxima

\pm mais ou menos

® marca registrada

% porcentagem

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	14
1. REFERENCIAL TEÓRICO	18
1.1 Agrotóxicos	18
1.1.1 <u>Visão histórica dos agrotóxicos</u>	20
1.1.2 <u>Classificações dos agrotóxicos</u>	23
1.1.3 <u>Princípio ativo: glifosato</u>	25
1.1.4 <u>Princípio ativo: triflumurom</u>	28
1.2 Biomarcadores Enzimáticos	30
1.3 Metabolismo de Xenobióticos	33
1.4 Atividades Enzimáticas	38
1.4.1 <u>Mono-oxigenases citocromos P-450 (CYP)</u>	38
1.4.2 <u>Esterases</u>	40
1.4.3 <u>Glutationa S-Transferase (GST)</u>	43
1.5 Espécie alvo	45
2. OBJETIVO GERAL	48
2.1 Objetivos Específicos	48
3. MATERIAL E MÉTODOS	49
3.1 Peixes	49
3.2 Obtenção das amostras	49
3.3 Preparo dos tecidos e dosagem de proteínas	50
3.4 Atividade enzimática do citocromo P-450	51
3.5 Atividade enzimática de esterases	53
3.6 Atividade enzimática de GST	55
3.7 Exposição dos peixes aos agrotóxicos <i>in vivo</i>	56
3.8 Ensaios <i>in vitro</i> com soro de dourado e xenobióticos	57
3.9 Semipurificação de carboxilesterase do soro de dourados	57
3.10 Eletroforese	59
3.11 Análise dos dados	59
4. RESULTADOS	60
4.1 Atividades enzimáticas do citocromo P-450	60
4.2 Atividade enzimática de esterases	62
4.3 Atividades enzimáticas da GST	67

4.4 Exposição dos peixes aos agrotóxicos <i>in vivo</i>	68
4.5 Ensaio <i>in vitro</i> com soro de dourado e xenobióticos	71
4.6 Semipurificação de carboxilesterase do soro de dourados	76
4.7 Eletroforese	78
5. DISCUSSÃO	80
CONSIDERAÇÕES FINAIS	92
REFERÊNCIAS	94

INTRODUÇÃO

A intensa dinâmica do uso do espaço físico resultante do aumento populacional expande a ocupação do solo das regiões próximas das fontes de água, exigindo investimentos crescentes em infraestrutura. Além de afetar a qualidade da água para consumo humano, as pressões resultantes de tal expansão também impactam os organismos aquáticos. Assim, para evitar o uso indiscriminado das águas e mitigar danos sobre o ambiente aquático, faz-se necessário controlar não só a emissão de poluentes, mas, sobretudo, avaliar seus efeitos sobre a biota.

As avaliações dos efeitos de poluentes sobre os seres vivos visam estimar com qual intensidade uma intervenção antrópica pode ocorrer sem que se altere em demasia o equilíbrio ecológico de uma área. A análise da qualidade ambiental de um ecossistema pode ser alcançada pelo uso de bioindicadores e biomarcadores, que indicam mudanças em sistemas biológicos.

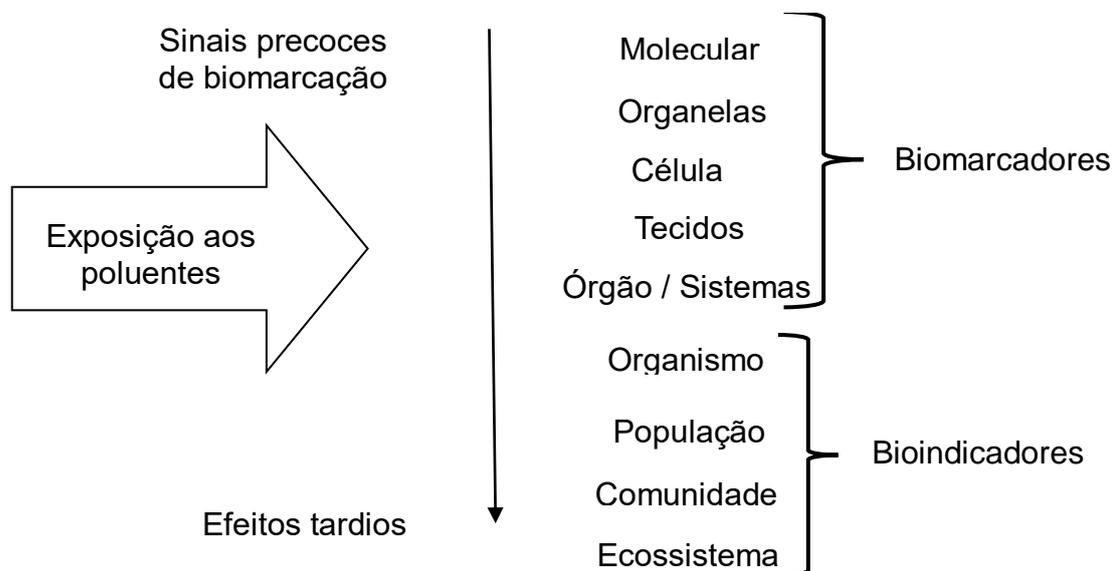
O bioindicador pode ser uma só espécie ou um grupo de espécies que reflete o estado biótico de um meio ambiente pela sua presença ou ausência, ou por mudanças comportamentais. Por exemplo, o uso de índices bióticos avalia a qualidade biológica de um ambiente aquático baseando-se na sensibilidade de alguns grupos de animais em relação a diversas fontes poluentes e na estimativa da riqueza total da comunidade de macroinvertebrados (ARIAS et al., 2007).

Os biomarcadores são amostras obtidas de animais que podem ser tecidos, células ou fluidos biológicos (WHO, 2004). Os indicadores medidos são comparados em um processo biológico normal com o valor obtido em um estado patogênico ou de estresse pelo o qual o ser vivo está exposto. Os biomarcadores podem fornecer medidas da exposição, do efeito tóxico e da susceptibilidade para compostos químicos. São muito úteis para avaliar e controlar o risco associado com a exposição por longo prazo a xenobióticos como metais pesados, hidrocarbonetos e pesticidas (GIL e PLA, 2001).

Em monitoramentos de ambientes aquáticos, indicadores em diferentes níveis de organização biológica fornecem informações complementares necessárias para a análise de risco ecológico (ARIAS et al., 2007). Segundo Van der Oost et al. (2003),

as respostas dos poluentes para o estresse dentro de um sistema biológico podem ser esquematizadas conforme demonstrado na Figura 1.

Figura 1 - Representação esquemática da sequência das respostas aos poluentes dentro de um sistema biológico.



Fonte: Adaptado de Van der Oost et al., 2003.

Entre os organismos para monitoramento em ambientes aquáticos, os peixes têm sido estudados como bioindicadores das condições de corpos hídricos, uma vez que estão presentes em diversos habitats e respondem a variações bruscas do meio ambiente. As agressões que os ambientes aquáticos sofrem podem afetar diretamente as populações de espécies nativas de peixes. O declínio dos estoques pesqueiros ocorre por diversos motivos, dentre os quais destacam-se: a sobrepesca, a poluição, o uso conflitante da água, a construção de barragens e reservatórios, o extrativismo, a introdução indiscriminada de espécies exóticas e as mudanças climáticas (CARNEIRO, 2007). Os peixes em ambientes com pesticidas podem absorvê-los através da pele, pela respiração e pela ingestão tanto da água poluída como de presas já contaminadas (GHAZALA et al., 2014). Outra consideração, conforme explicam Arias et al. (2007), é que os impactos da contaminação por agrotóxicos em peixes variam de acordo com os tipos de substâncias empregadas, com a sua toxicidade e com a sua estabilidade nos ambientes aquáticos, sendo que os efeitos incluem desde alterações da fisiologia de alguns organismos, até a morte maciça de populações, afetando toda a estrutura da comunidade. É importante

ressaltar que essas alterações em muitos casos são espécie-específicas; as diferenças entre as espécies podem determinar quais serão as mais afetadas ou quais poderão sobreviver à contaminação por determinado agrotóxico (FRAGA, 2010; CUNHA BASTOS et al., 2004).

Os principais malefícios à saúde e ao meio ambiente, principalmente nos meios aquáticos, causados pelo despejo de efluentes não tratados e pela expansão do uso de produtos químicos ficam evidentes pelos efeitos agudos. Entretanto, efeitos subletais ainda não foram compreendidos em toda a sua extensão. Desta forma, o maior entendimento dos processos dos distúrbios iniciais dos sistemas biológicos auxilia a promover o desenvolvimento sustentável. Alterações bioquímicas são interessantes biomarcadores para verificar o desequilíbrio em um determinado ecossistema, pois são das mais precoces alterações que podem ser detectadas, antes mesmo de que ocorra piora definitiva da saúde dos animais. Além disso, as informações geradas podem contribuir para a aquicultura. A produção de peixes é uma atividade de crescente importância para qualquer país, sendo interessante o desenvolvimento de tecnologias que contribuam para a consolidação da atividade, como manejos que auxiliem na reprodução dos peixes em cativeiro e ensaios que indiquem antecipadamente possíveis efeitos deletérios à saúde dos animais em cultivo, evitando grandes mortalidades e prejuízos financeiros.

Meu trabalho visa verificar se ocorrem alterações bioquímicas em peixes causadas por poluentes, comparando as atividades enzimáticas de diferentes espécies. O grupo de pesquisa do Laboratório de Bioquímica Toxicológica, no Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), junto ao qual realizo este estudo, pesquisa efeitos de poluentes sobre enzimas do metabolismo de peixes expostos a estresse oxidante e a xenobióticos. O grupo visa compreender como tais enzimas atenuam ou intensificam a intoxicação de peixes, com a vantagem de que os resultados podem ser usados na pesquisa de biomarcadores de intoxicações subletais de poluição. Entre suas linhas de pesquisa destaco a relacionada com enzimas de biotransformação de xenobióticos em peixes nativos (BASTOS et al., 2013; RODRIGUES, 2003), especialmente com as espécies que ocorrem na bacia Platina, como o pacu, *Piaractus mesopotamicus*, o piauçu, *Leporinus macrocephalus*, e o

curimbatá, *Prochilodus lineatus* (CAMACHO et al., 2000; CUNHA BASTOS, 2001; CUNHA BASTOS et al., 2004; FRAGA, 2010; SALLES et al., 2006; SILVA, 2013).

Especificamente, eu busquei estabelecer ensaios das atividades de algumas das enzimas das vias de biotransformação de xenobióticos do peixe dourado, *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816), que permitissem avaliar se exemplares de vida livre estão sofrendo efeito de poluentes. O dourado é encontrado na bacia do Rio da Prata ou Platina, que é formada por três sub-bacias hidrográficas: bacia do Paraná, bacia do Paraguai e bacia do Uruguai. A bacia Platina além da sua ampla extensão, é importante por conter os assentamentos humanos mais importantes da América do Sul e é uma das maiores reservas mundiais de água doce. Segundo Zarrilli (2013), a bacia Platina é um complexo entremeado de pessoas, planícies e rios que a partir da segunda metade do século XX sofreu mudanças extremas devido ao crescimento industrial vertiginoso em muitas das sub-bacias, com uma notável concentração populacional; inúmeros projetos hidrelétricos; aumento da fronteira agrícola; aumento dos processos de desmatamento e o uso massivo de agrotóxicos.

O programa de pós-graduação em Meio Ambiente da UERJ tem como um dos objetivos produzir conhecimento e formar recursos humanos multidisciplinares, qualificando docentes e pesquisadores para atuação crítica e reflexiva. Desta forma, a construção do referencial teórico foi realizada pensando sobre o uso de agrotóxicos e em como os ensaios das atividades enzimáticas dos peixes podem ajudar no biomonitoramento de ambientes aquáticos.

1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Agrotóxicos

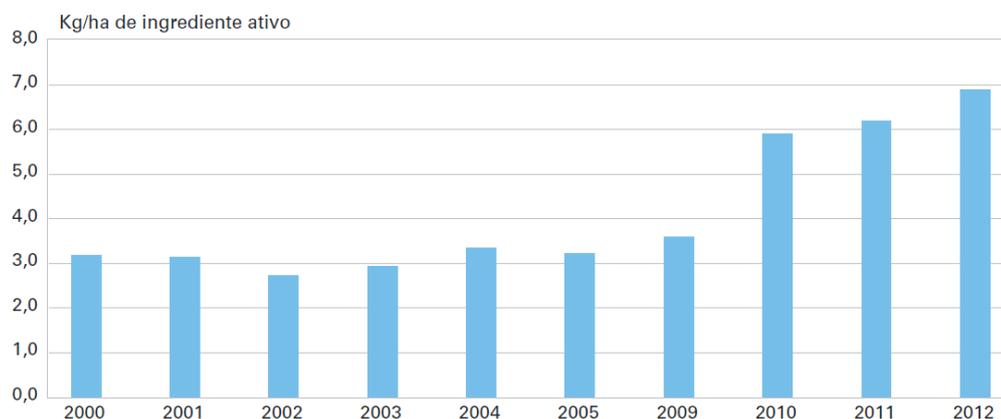
Os agrotóxicos são muito usados na agricultura. Para os efeitos da lei brasileira (lei nº 7.802 de 11 de julho de 1989) consideram-se agrotóxicos e afins os produtos e os agentes físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso na produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, proteção de florestas (nativas ou implantadas) e em outros ecossistemas. Alternativamente, os agrotóxicos também podem ser utilizados em ambientes urbanos, hídricos e industriais com a finalidade de alterar a composição da flora ou da fauna de forma a preservá-las da ação danosa de outros seres vivos (BRASIL, 1989).

Os benefícios advindos da utilização de agrotóxicos difundiram-se rapidamente, sustentados, sobretudo, pela eficácia no combate às pragas. O corolário da introdução dessa inovação tecnológica foram os crescentes ganhos de produtividade nas lavouras proporcionados pelo seu uso de forma intensiva, o que consolidou esses produtos no mercado, interferindo de forma crítica nos hábitos dos produtores e consumidores de alimentos, assim como no meio ambiente. Além disso, alguns agrotóxicos, principalmente os pesticidas, ganharam outros mercados na atividade pecuária e nos espaços urbanos para diminuição de mosquitos vetores de doenças e outros animais indesejados, como ratos e baratas.

Os agrotóxicos podem ser persistentes, móveis e tóxicos no solo, na água e no ar. Tendem a acumular-se no solo e na biota. Seus resíduos podem chegar às águas superficiais por escoamento e até às subterrâneas por lixiviação. A publicação do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE - intitulada “Indicadores de Desenvolvimento Sustentável: Brasil 2015 (IBGE, 2015)” aborda que a exposição humana e ambiental aos agrotóxicos cresce em importância com o aumento das vendas, assim como que seu uso intensivo está associado a agravos à saúde da população (consumidores dos alimentos e trabalhadores que lidam diretamente com os produtos) e à degradação do meio ambiente. Os agrotóxicos estão entre os principais instrumentos do atual modelo de desenvolvimento da agricultura brasileira,

como pode ser notado pelo gráfico da Figura 2 em que se mostra o crescente aumento da sua comercialização.

Figura 2 - Gráfico da comercialização anual de agrotóxicos e afins, por área plantada no Brasil entre 2000 e 2012.



Fonte: IBGE - Indicadores de Desenvolvimento Sustentável: Brasil 2015 (IBGE, 2015)

Segundo Machado (2014), a agricultura foi importante para geração de riquezas no Brasil. O autor questiona a que preço e para quem esta riqueza está sendo gerada, uma vez que os maiores beneficiados são empresas transnacionais do setor de agroquímicos que construíram no país o maior mercado consumidor desse tipo de produto no planeta. Com o frequente e intenso uso de uma variedade de agrotóxicos tornou-se claro que eles estão perturbando seriamente os sistemas ecológicos dos quais depende a nossa existência, com um correspondente aumento dos problemas de saúde dos indivíduos (CAPRA, 1999).

Os lucros do setor de agroquímicos estão concentrados em poucos países, em empresas de capital estadunidense, alemão e suíço. Alguns dos agrotóxicos produzidos por estas indústrias são proibidos nos seus países de origem, contudo são comercializados em países como Brasil, México, Argentina e Índia. Isto forma um círculo de envenenamento que tem uma indústria sediada na União Europeia e/ou Estados Unidos que vende produtos químicos que retornam nos alimentos ou em *commodities* exportando, assim, uma parte da produção alimentar que gera impactos ambientais (BOMBARDI, 2017).

Alves Filho (2002) aponta que muitos impactos sociais, ambientais e econômicos decorrentes do uso de agrotóxicos na atividade agrícola são já bastante

conhecidos e que as formas de disponibilidade, acesso e utilização destes insumos no processo produtivo repercute diretamente sobre vários interesses presentes nessa rede. Nesta rede, entremeados, há vários fatores que colaboraram para que o uso de agrotóxicos fosse amplamente difundido. Um desses fatores é o constante crescimento populacional que traz inevitavelmente movimentos que influenciam intensamente a dinâmica do uso dos solos, a demanda por água potável e por alimentos para atender as necessidades básicas de subsistência dessa população. Aliado a este aumento, os avanços e transformações no modo de vida da maioria das sociedades trouxe confortos, mas também infortúnios. Assim, é preciso analisar estes eventos de forma ampla e reflexiva para vislumbrar novos conhecimentos e estabelecer condições para progredir e resolver os problemas surgidos.

1.1.1 Visão histórica dos agrotóxicos

Para compreender o uso que fazemos hoje dos agrotóxicos, com seus problemas e benefícios, é fundamental conhecer a sua história, que se desenrola desde o começo do uso do solo pelo homem. Com o domínio da prática da agricultura foi possível obter alimento de forma constante e em uma mesma região, ou seja, a agricultura permitiu a existência de aglomerados humanos com maior densidade populacional em áreas delimitadas. Rituais religiosos e calendários foram criados em torno da prática da agricultura devido ao reconhecimento da sua importância pelas civilizações. Também registros de interferências humanas nas plantações, geralmente, em resposta às pragas, são bastante antigos. Mesmo que existisse forte apelo espiritual e religioso relacionados às plantações, os povos da antiguidade, como os sumérios (2500 a.C.), usavam o enxofre, extratos de fontes termais e de minas de galena (sulfeto de chumbo) e pirita (dissulfeto de ferro) no combate aos insetos. Os egípcios (1800 a.C.) utilizavam plantas, como a mirra. No século XIV os chineses começaram o uso de arsênico no controle de insetos, além de métodos de combate que incluíam ervas, flores, óleo e cinzas (ALVES FILHO, 2002).

Diversas civilizações passaram por o aumento do número de pessoas de forma desproporcional à quantidade de alimentos produzidos, despertando preocupação por

parte dos governantes e dos estudiosos com a necessidade de procurar novas fontes para manter a população. Como alimentar uma quantidade de pessoas cada vez maior no mundo? Em busca de respostas para esta pergunta diferentes alternativas foram aplicadas de acordo com os conhecimentos de cada povo e de cada época.

No final do século XVIII Thomas Malthus expôs ideias que marcaram a humanidade, apresentando como princípio fundamental da sua hipótese o fato que as populações humanas crescem em progressão geométrica, mas a oferta de alimento poderia crescer somente em progressão aritmética. Desta forma, ele concluiu que seria o aumento da população que deveria ser contido de algum modo (RIMA, 1977). A famosa teoria de Malthus perdeu força com o avanço das técnicas agrícolas, que possibilitaram equilibrar a razão população/alimentos através do aumento da quantidade de alimentos.

Os problemas com pragas se agravaram na metade do século XIX e dado que a química também se expandia, iniciou-se o uso de misturas de compostos orgânicos com capacidade inseticida e herbicida nas lavouras que, até então, somente utilizavam compostos em seu estado natural ou inorgânicos. Mas foi no final do século XIX e início do século XX que a técnica de uso de misturas químicas nas plantações firmou-se com o desenvolvimento de compostos orgânicos sintéticos. Um marco clássico deste desenvolvimento foi em 1939 com a descoberta das propriedades inseticidas do famoso DDT (Dicloro-Difenil-Tricloroetano) pelo pesquisador Paul Müller, que trabalhava como químico para uma empresa suíça no desenvolvimento de vários produtos químicos para combater os insetos. O DDT é um composto orgânico que foi sintetizado por Otto Ziedler em 1874, mas foi o seu uso como inseticida que revela um marco revolucionário nas tecnologias até então empregadas para o combate às pragas (ALVES FILHO, 2002). O uso do DDT desencadeou mudanças significativas na área da saúde pública, pelo combate de mosquitos transmissores de doenças, principalmente da malária. Na área da agricultura, o DDT firmou-se devido a sua eficácia contra pragas e consequente aumento na produção de alimentos. Pelos imediatos êxitos alcançados o pesquisador Paul Müller foi contemplado com o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina do ano de 1948.

O processo tradicional de produção agrícola sofreu mudanças com a inserção de novas técnicas que envolvem, quase em sua maioria, máquinas apropriadas para o campo, uso de variedades de sementes com alto rendimento e resistência, produção

em massa de monoculturas, melhoramento genético e o uso de insumos agrícolas (fertilizantes e agrotóxicos) com a finalidade de controlar doenças e aumentar a produtividade (MMA, 2014). A combinação dessas tecnologias recebeu o nome de Revolução Verde e valeu o prêmio Nobel da Paz para o cientista americano Norman Borlaug em 1970 (REINACH, 2010). As ações da Revolução Verde foram intensas na década de 1950, atendendo a demanda mundial por alimentos e reconstruindo um mundo pós-guerra. Desta forma, não somente a necessidade geral de alimento foi superada, como também foi possível obter excedentes da produção das lavouras, criando uma nova variável no debate sobre a agricultura, os insumos utilizados e o provimento de alimentos.

Na comunidade científica havia muitas reservas quanto ao uso indiscriminado dos produtos químicos no ambiente, principalmente do DDT, que foi chamado de "inseticida perfeito". Ao final de 1950 e início dos anos 60 surgem os primeiros processos de reavaliação dos problemas de segurança e eficácia dos agrotóxicos. A visão dos danos decorrentes do uso generalizado de substâncias químicas para o combate às pragas foi em grande parte influenciada por denúncias que culminaram na publicação do livro *Silent Spring* (Primavera Silenciosa) da pesquisadora americana Rachel Carson em 1962. As teses sustentadas pelo livro ressaltaram os riscos crescentes envolvidos na manutenção dos padrões de uso dos agrotóxicos e a necessidade urgente de mudanças em busca de práticas alternativas de menor impacto para o ambiente e para a saúde humana (ALVES FILHO, 2002).

No posfácio do livro Primavera Silenciosa, Edward Wilson resume que o grande feito de Rachel Carson foi sintetizar o conhecimento até então disponível em uma única imagem que todos, tanto os cientistas, quanto a população em geral, entendiam facilmente (CARSON, 2010). Carson (2010) afirma que a poluição desencadeia males não apenas no mundo que deve sustentar a vida, mas nos tecidos vivos, e, na maior parte, de forma irreversível. Por exemplo, os inseticidas sintéticos se distinguem dos inseticidas mais simples dos tempos anteriores à guerra pela sua enorme potência biológica, podendo penetrar e alterar processos vitais dos organismos, destruir enzimas cuja função é proteger contra danos, bloquear processos de oxidação que fornecem energia para o corpo, impedir o funcionamento normal de órgãos vitais, desencadeando em certas células a lenta e irreversível mudança que conduz às doenças malignas.

1.1.2 Classificações dos agrotóxicos

Além da denominação agrotóxicos, estes compostos químicos também são chamados de pesticidas e praguicidas. Como praga entende-se todo organismo vivo que ocorre em local não desejado ou que causa danos às plantações, aos humanos ou a outros animais (BIANCHINI, 2008). Este grande grupo de produtos são classificados de diversas maneiras, de acordo com critérios que busquem facilitar a identificação e o estudo dos diferentes tipos. São classificados em relação à sua estrutura química, sua origem, aos efeitos que causam à saúde humana, à toxicologia ou ao seu modo de ação. As classificações de maior interesse para este estudo são brevemente apresentadas a seguir, baseadas nos tipos de praguicidas apresentado por Bianchini (2008):

- Quanto ao tipo de praga:

Esta classificação provavelmente é a mais ampla e popular, pois está relacionada com o tipo de praga que o composto controla. Nesta divisão os agrotóxicos podem ser classificados como inseticidas, herbicidas, fungicidas, rodenticidas, algicidas, acaricidas e nematicidas.

- Quanto à natureza química:

Conforme a presença e estrutura dos elementos químicos na molécula, os inseticidas podem ser organizados como organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretroides.

Os organoclorados apresentam em sua estrutura átomos de carbono e cloro e são resistentes à hidrólise, entretanto, sofrem reações fotoquímicas formando derivados com estabilidade e toxicidade similares ou até maiores do que as dos compostos de origem. Por serem lipossolúveis causam danos persistentes ao meio ambiente devido à grande estabilidade física e química, podendo ser acumulados na cadeia trófica (SANCHES et al., 2003). São neurotóxicos, atuando no retardamento do fechamento dos canais de sódio e possuem efeitos carcinogênicos.

Os organofosforados entraram no mercado para substituir os organoclorados. No entanto, apesar da rápida degradação dos organofosforados no

ambiente, estes são altamente tóxicos e podem causar danos irreversíveis. Os compostos organofosforados podem ser comercializados como fosfotioatos (com P=S na estrutura) sem capacidade para inibir esterases. Mas, quando no organismo, sofrem ação de mono-oxigenases e o enxofre de sua estrutura é trocado por um oxigênio compondo fosfatos (P=O na estrutura). Este processo bioativa a molécula, formando um organofosfato que é mais tóxico e inibe as colinesterases de sinapses colinérgicas.

Os carbamatos estão intimamente relacionados com os inseticidas organofosforados quanto ao desenvolvimento de resistência e ação biológica, pois também inibem as colinesterases. Entretanto, a duração e intensidade da intoxicação são menores do que a dos compostos organofosforados. Carbamatos são derivados do ácido carbâmico e, provavelmente, são os inseticidas com o mais amplo espectro dos biocidas (FRAGA, 2010).

Os piretroides são o resultado de tentativas de modificar a estrutura das piretrinas naturais, a fim de diminuir a fotossensibilidade. O inseticida natural consiste em uma mistura de ésteres inseticidas (piretrinas, cinerinas e jasmolinas) extraída de flores de crisântemo (*Chrysanthemum cinerariaenum cinerariaefolium* e *Chrysanthemum coccineum*). Essas moléculas são ésteres e, geralmente, contêm um anel de dimetilciclopropano ligado a vários radicais. Os piretroides são biotransformados rapidamente no organismo de mamíferos, principalmente no fígado. A reação inicial de desintoxicação é a hidrólise da ligação éster, resultando na formação de compostos mais polares, o que facilita sua excreção pela urina. Alguns estudos ecotoxicológicos mostram que os piretroides estão entre os mais tóxicos para organismos aquáticos (PIMPÃO et al., 2007).

- Quanto ao grau de toxicidade:

Esta divisão serviu como base para a Lei nº 7.802/1989 que foi regulamentada pelo Decreto nº 4.074/2002. O decreto dispõe sobre vários aspectos dos agrotóxicos, como a produção, a embalagem e rotulagem, a comercialização, a utilização, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de seu uso (BRASIL, 2002). Neste decreto fica estabelecido que o conjunto dos Ministérios da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Saúde e do Meio Ambiente, assim como suas agências e institutos vinculados,

possuem responsabilidades de acordo com o âmbito de suas respectivas áreas de competências.

A avaliação toxicológica é uma das etapas obrigatórias no processo de registro de agrotóxicos. Este procedimento é acompanhado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa - para avaliação do risco para a saúde humana decorrente da exposição à substância em análise (ANVISA, 2015). Com estes dados são estipulados o grau de toxicidade do agrotóxico, considerando a toxicidade para o ser humano e sua interação com o ambiente. Após uma gama de testes é estabelecido o potencial de periculosidade do agrotóxico, cuja a classificação é dividida em quatro classes (IBAMA, 2015):

- 1) Classe I - extremamente tóxica (faixa vermelha).
- 2) Classe II - altamente tóxica (faixa amarela).
- 3) Classe III - medianamente tóxica (faixa azul).
- 4) Classe IV - pouco tóxica (faixa verde).

Com a percepção, os estudos e a divulgação dos danos colaterais causados pelos produtos químicos sintetizados foram proibidos inicialmente os compostos organoclorados, na década de 1980. Anos depois os organofosforados e carbamatos foram banidos e, recentemente, alguns piretroides. Paralelamente às proibições, nos anos 90, se iniciou uma nova abordagem dos princípios que inspiram o desenvolvimento da indústria de agrotóxicos. Estes novos princípios são baseados nos conhecimentos de biologia molecular e engenharia genética, o que muito contribui para o aprimoramento da tecnologia dos agrotóxicos (ALVES FILHO, 2002).

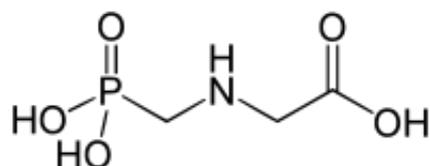
No Brasil, segundo Bombardi (2017), tem-se 504 ingredientes ativos com registro autorizado. Entretanto, 149 destes são proibidos na União Europeia, ou seja, 30%. Alguns já foram vetados há mais de uma década, mas, no Brasil, continuam entre os dez mais vendidos.

1.1.3 Princípio ativo: glifosato

O glifosato (n-(fosfometil)glicina) é o princípio ativo de herbicidas não seletivos, como o Roundup® da empresa Monsanto. O glifosato é classificado como um

organofosfatado, pois possui um grupo fosfato em sua composição. A fórmula molecular do glifosato é $C_3H_8NO_5PO$, possuindo massa molecular igual a 169,1 g/mol (Figura 3). Nos produtos comerciais herbicidas com glifosato, geralmente, ele está na concentração de 48% dissolvido em solventes inertes, que nem sempre são listados nas fichas técnicas do produto.

Figura 3 - Fórmula estrutural plana do glifosato.



Fonte: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Glifosato>

Herbicidas contendo o glifosato são amplamente utilizados nas lavouras mundiais para matar ervas que competem com a espécie semeada, prejudicando o rendimento da planta cultivada. Também pode ser aplicado na água para o controle de ervas aquáticas (AMARANTE JÚNIOR et al., 2002). O princípio ativo glifosato é o mais usado em herbicidas, correspondendo a 62,4% dos ingredientes ativos de herbicidas comercializados no Brasil (IBGE, 2015). É usado, principalmente, nas monoculturas transgênicas de soja, milho e algodão, uma vez que estas usam sementes tolerantes ao glifosato (BOMBARDI, 2017).

A escolha do princípio ativo glifosato como herbicida neste estudo deu-se pelo seu intenso uso em lavouras localizadas na bacia do Prata, local em que habita o peixe dourado, *Salminus brasiliensis*. Segundo Bombardi (2017), quanto a distribuição do uso de glifosato no Brasil, o estado do Mato Grosso lidera o consumo, seguido do Paraná e Rio Grande do Sul. Territórios destes estados estão na bacia Platina, portanto seus rios podem ser contaminados por agrotóxicos aplicados nas lavouras.

Em diversos tipos de cultivo o glifosato costuma ser pulverizado e absorvido pela planta através de suas folhas e dos caulículos novos. Depois, é transportado por toda a planta, inibindo a enzima 5'-enolpiruvilchiquimato-3'-fosfato sintase (EPPS), que é a enzima-chave da via do chiquimato na biossíntese de compostos aromáticos em plantas e alguns microrganismos. Assim, a inibição da EPPS suprime a síntese de proteínas e metabolitos secundários, por exemplo flavonóides, lignina ou cumarinas,

e desregula o metabolismo energético. As plantas tratadas com glifosato morrem em poucos dias ou semanas e, devido ao transporte por todo o organismo, nenhuma parte da planta sobrevive (AMARANTE JÚNIOR et al., 2002; HERRMANN e WEAVER, 1999).

Segundo Herrmann e Weaver (1999), os compostos químicos que interferem com qualquer atividade desta enzima nesta via são considerados seguros para os seres humanos quando usados em concentrações razoáveis, uma vez que o homem não contém a enzima na qual o glifosato atua. No entanto, os estudos conduzidos com o glifosato relatam resultados adversos sobre os animais. Machado (2016) analisa com clareza a trajetória e a emergência de controvérsias em torno do herbicida glifosato, questionando como e por que o glifosato, considerado por muito tempo o mais seguro e sustentável de todos os herbicidas, passa a ser questionado quanto à sua sustentabilidade e segurança. A autora demonstra que os discursos sobre o glifosato se transformaram, tendo diferentes atores que se posicionam a favor e contra seu uso.

Nos seres humanos, os problemas comumente relatados são dermatológicos e de irritação da mucosa ocular. Pesquisas afirmam que o glifosato é um dos agroquímicos que possui menor impacto na saúde humana; sendo respeitadas as indicações de uso, enquanto outros estudos comprovam a participação do glifosato na possível indução de câncer. Numa percepção histórica, o glifosato não enfrentou grandes desvios até final da década de 1990, tornando-se o “herbicida do século”. Porém, com o tempo, problemas têm sido levantados em relação aos riscos à saúde e a ameaça ambiental causados pelo uso intensivo do herbicida, colocando em evidência as complexas relações entre agências governamentais, indústrias privadas e a ciência (MACHADO, 2016).

Neste contexto, estudos com peixes iniciam a ser publicados após os anos 2000 e apontam efeitos pontuais após a exposição ao glifosato. Por exemplo, Lushchak et al. (2009) dizem apresentar o primeiro estudo que demonstra uma resposta sistemática pelos sistemas antioxidantes de peixe exposto ao Roundup®. Os autores verificaram biomarcadores de estresse oxidativo e defesa antioxidante no peixinho dourado, *Carassius auratus*, exposto ao Roundup® por 96 horas em concentrações entre 2,5 – 20 mg L⁻¹. Segundo os autores, alguns marcadores não foram afetados, como os níveis de peróxidos lipídicos no cérebro e fígado. No entanto,

a exposição suprimiu as atividades de superóxido dismutase, glutathione S-transferase, glutathione reductase e glicose-6-fosfato desidrogenase em distintos tecidos. Guilherme et al. (2010) avaliaram o potencial genotóxico de Roundup® às células sanguíneas da enguia europeia (*Anguilla anguilla*) por um e três dias. Os resultados apontam que este herbicida mostrou a capacidade de induzir dano ao DNA nos peixes expostos, aumentando o fator de risco para as futuras gerações com efeitos a longo prazo, como distúrbios reprodutivos e desenvolvimento de câncer. Gholami-Seyedkolaei et al. (2013) investigaram os efeitos da toxicidade do Roundup® em doses agudas e subletais no peixe *Cyprinus carpio*, a carpa comum. Os resultados demonstraram que após cinco dias de exposição houve decréscimo na atividade enzimática da acetilcolinesterase no músculo, no cérebro e no fígado.

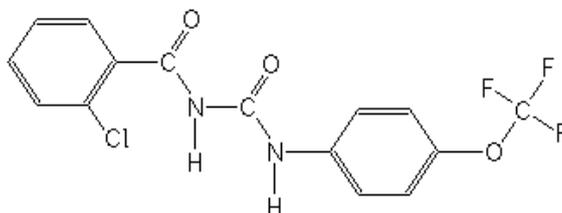
Testes realizados com o peixe neotropical *Prochilodus lineatus*, o curimatá, demonstraram que a exposição por 6, 24 e 96 horas ao Roundup® em concentrações subletais induziu alterações bioquímicas, fisiológicas e histológicas. As análises de atividades enzimáticas mostraram alterações dependendo do tecido e tempo de exposição. Por exemplo, a AChE foi inibida no cérebro e no músculo, enquanto que a catalase aumentou no fígado (LANGIANO e MARTINEZ, 2008; MODESTO e MARTINEZ, 2010). Menezes et al. (2011) verificaram algumas enzimas indicadoras de estresse oxidativo em jundiás nativos (*Rhamdia quelen*) expostos ao Roundup®. Os resultados indicaram que a exposição por oito dias ao herbicida é capaz de causar estresse oxidativo nos tecidos.

1.1.4 Princípio ativo: triflumurom

O triflumurom é um inseticida do grupo químico das benzoilureias. Foi a primeira benzoilureia a ser comercializada, sendo introduzida no mercado no ano de 1978 pela empresa Bayer da Alemanha com o nome de Alsystin® (WARE e WHITACRE, 2004). Desde então, outras apareceram como o bistrifluron, chlorfluazuron, diflubenzuron, flufenoxuron, hexaflumuron e novaluron. De modo geral, estes inseticidas atuam na regulação do crescimento do inseto, impedindo seu desenvolvimento normal. O nome químico do triflumurom é 1-(2-clorobenzoil)-3-(4

trifluorometoxy-fenil) ureia, tendo como fórmula $C_{15}H_{10}ClF_3N_2O_3$. Sua fórmula estrutural é demonstrada na figura 4.

Figura 4 – Fórmula estrutural plana do triflumurom.



Fonte: <http://www.alanwood.net/pesticides/triflumuron.html>

Segundo a ANVISA o ingrediente ativo triflumurom, sinonímia trifluron, está na lista de ingredientes ativos de uso autorizado no Brasil, possui classificação toxicológica classe IV e seu uso é recomendado na aplicação foliar em culturas de abobrinha, algodão, batata, cana de açúcar, citros, fumo, milho, soja, tomate e trigo.

Em nosso estudo usamos para os testes o inseticida de nome comercial Certero® da empresa Bayer. Segundo a bula, o composto possui 480 g/L do princípio ativo triflumurom e seu modo de ação nos insetos é por inibição da síntese de quitina, polissacarídeo de suas carapaças. Os mecanismos de toxicidade em mamíferos, infelizmente, ainda não são completamente conhecidos.

A escolha deste produto foi por causa do seu uso nas criações de peixes para o tratamento da lerneose. A lerneia é o nome comum de uma doença causada por espécies exóticas de ectoparasitos do gênero *Lernaea sp.*, também conhecido como “verme-âncora”. Apesar do nome, a lerneia é um crustáceo de tamanho pequeno, pouco visível pelo piscicultor e que pode causar prejuízos à piscicultura. Embora o hospedeiro-tipo da lerneia seja a carpa, este copépode é capaz de parasitar, com sucesso, diversas espécies de peixes, nativos ou não, cultivados ou não. No local que o parasita se fixa e penetra no corpo do peixe hospedeiro ocorre hemorragia e inflamação com posterior necrose do tecido circundante. Estas ulcerações facilitam o ataque por fungos e bactérias, amplificando indiretamente a ação patogênica deste parasito. Lerneas são hematófagas e, portanto, uma das consequências deste parasitismo é também o desenvolvimento de anemia intensa no peixe (BOEGER, 1999).

Assim como os insetos, os crustáceos possuem exoesqueleto formado por quitina. Desta forma, o inseticida lançado na água dos viveiros de piscicultura interfere

no desenvolvimento regular da lerneia, impedindo a formação da carapaça de quitina levando as larvas e indivíduos adultos que passam pela ecdise à morte. Segundo a bula do agrotóxico, a principal rota de biotransformação do triflumurom em animais é pela hidroxilação. Também altas doses orais não foram completamente absorvidas, mas, o que foi absorvido, pareceu ser rapidamente e completamente metabolizado por hidroxilação e hidrólise.

Na bibliografia há estudos envolvendo triflumurom e organismos não alvo do inseticida, como abelhas (AMIR e PEVELING, 2004) e minhocas (BADAWY et al., 2013). O estudo com minhocas demonstrou que a taxa de crescimento relacionada com o nível de atividades de certas enzimas pode resultar na utilização das minhocas como bioindicadores para solo contaminado com pesticidas.

O relatório científico da Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar sobre a avaliação do risco de pesticidas da substância ativa triflumurom concluiu que este é bastante tóxico para invertebrados aquáticos, porém possui baixa toxicidade para peixes e algas (EFSA, 2008). Estudos envolvendo peixes e triflumurom são escassos. Há um relato em um congresso que avaliou o potencial genotóxico e citotóxico em peixes do gênero *Astyanax* sp., comumente conhecidos como lambari, submetidos ao triflumurom. Não foi verificada a presença de micronúcleos, mas o número de anormalidades nucleares foi maior no grupo exposto do que no controle (JABLONSKI et al., 2017).

1.2 Biomarcadores Enzimáticos

Seguir um agrotóxico no ambiente é bastante trabalhoso, bem como a avaliação do seu impacto, pois quaisquer substâncias passam por processos físicos, químicos ou biológicos, os quais podem modificar as suas propriedades e influenciar seu comportamento, inclusive com a formação de subprodutos e derivados com propriedades distintas do produto inicial, cujos danos à saúde ou ao meio ambiente também são diferenciados (MMA, 2014). Estes derivados podem interagir com os organismos causando múltiplas alterações, dependendo de sua natureza química, do grau de contaminação e do tempo de exposição.

Tradicionalmente, as técnicas para a avaliação destes impactos utilizando bioindicadores vêm sendo divididas em duas abordagens principais: a) aquelas associadas aos níveis superiores de organização, tais como populações, comunidades e ecossistemas; b) aquelas do nível individual, que trata de alterações comportamentais, malformações, mudanças nas taxas de crescimento, reprodução, alimentação, alterações bioquímicas e fisiológicas – que inclui alterações na integridade da membrana celular, no transporte de íons, no metabolismo celular e em atividades enzimáticas (ARIAS et al., 2007).

Os biomarcadores podem ser divididos em três grupos:

- Biomarcadores de exposição fazem a detecção de uma substância exógena, de seus metabólitos ou de padrões de interação com moléculas das células do organismo. Possibilitam confirmar a presença de poluentes específicos em fluidos corporais ou excreções, tais como sangue, urina e ar expirado.
- Biomarcadores de suscetibilidade estão compreendidos pela capacidade de resposta inerente ou adquirida pelo organismo quando exposto ao poluente. Permitem elucidar a variação de resposta encontrada entre diferentes indivíduos submetidos aos poluentes. Podem ser marcadores genéticos, como alterações na estrutura cromossômica.
- Biomarcadores de resposta ou efeito são avaliações bioquímicas, fisiológicas, comportamentais ou qualquer outra alteração que possa ser reconhecida ou associada com danos à saúde do organismo. Possui função de evidenciar alterações pré-clínicas e efeitos à saúde pela exposição e absorção das substâncias. Os biomarcadores de efeito devem ser detectados o mais cedo possível e serem capazes de mostrar efeitos adversos antes que estes sejam irreversíveis. Esses são os biomarcadores mais estudados e incluem modificações em alguns parâmetros da composição do sangue, alterações da atividade de enzimas específicas, aparecimento de anticorpos específicos, aumentos localizados de ácido ribonucleico mensageiro e de proteínas.

Para o uso de biomarcadores em monitoramento ambiental é importante que alguns critérios sejam avaliados a fim de que as análises sejam úteis e permitam prever condições de danos ao ambiente. Pode-se citar como pontos importantes para a escolha do biomarcador a compreensão da relação deste com os agentes de

exposição, a confiabilidade e a sensibilidade da análise; se mostra diferenças significativas entre o valor normal e quando submetido ao estressor, sua importância toxicológica e que resulte de um método pouco invasivo, não destrutivo.

Os biomarcadores enzimáticos são a quantificação da atividade enzimática nos organismos. As reações enzimáticas agem de tal forma que permitem obter informações sobre a saúde dos animais e do ambiente que eles habitam através da análise de uma amostra de órgãos vivos. É interessante ressaltar que biomarcadores enzimáticos apresentam respostas subletais, ou seja, podem indicar danos precoces, antes que lesões teciduais se estabeleçam e antes que ocorra mortandade. Maneiras para estabelecer sinais de alerta rápidos que reflitam as respostas biológicas adversas devido às alterações antropogênicas destacam-se nas pesquisas porque possibilitam ações antes de um dano extremo.

Determinados grupamentos químicos presentes nas moléculas originais dos agrotóxicos ou em seus metabolitos interagem com grupamentos químicos presentes nas enzimas, podendo causar impedimentos para a catálise. Também foi demonstrado que a atividade de algumas enzimas pode aumentar por indução de sua biossíntese após exposição a certos agrotóxicos (VAN DER OOST et al., 2003).

De modo geral, todos os pesticidas podem causar efeito sobre a vida aquática e a qualidade da água, porém nem todos os envenenamentos por pesticidas resultam na morte imediata de um animal aquático. No caso de uma intoxicação aguda de um peixe, por exemplo, a morte pode ocorrer por disfunções neurológicas progressivas, espasmos coronarianos induzidos pelo excesso de acetilcolina e/ou asfixia ou irritação das brânquias (VAN DER OOST et al., 2003). No entanto, segundo Helfrich et al. (1996) repetidas e pequenas doses subletais de alguns pesticidas podem levar a mudanças de comportamento dos indivíduos que podem afetar uma população. Destacamos aqui, a redução da motilidade causada pela inibição parcial da acetilcolinesterase, o que dificulta a procura por alimentos e a fuga de predadores. Também a redução da reprodução, resultado do retardo no desenvolvimento e na maturação sexual, além de reduzir a qualidade dos gametas e, conseqüentemente, a viabilidade dos ovos. Ainda a diminuição da tolerância aos extremos de temperatura, deixando os peixes mais suscetíveis a alterações normais de seus habitats, uma vez que são animais pecilotérmicos.

1.3 Metabolismo de Xenobióticos

Em sistemas vivos as catálises de reações químicas por enzimas aceleram a conversão de um composto (substrato) em outro composto diferente (produto) ao propiciar que milhões de moléculas de substrato entrem no estado de transição em curtíssimo tempo. Em geral, as enzimas apresentam propriedades para reagir com moléculas produzidas nas células dos organismos, mas também podem reagir com qualquer composto que possua em sua estrutura grupos de átomos arranjados semelhantemente aos dos seus substratos naturais. Este é o caso dos xenobióticos, que são substâncias que não foram produzidas pelo organismo, mas que podem reagir com enzimas.

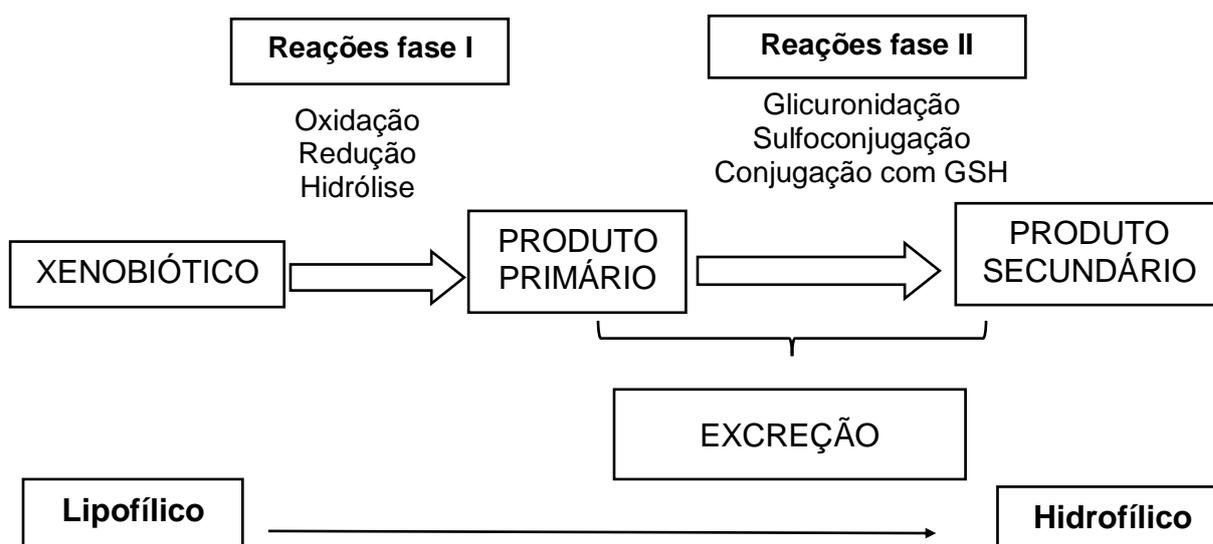
O termo xenobiótico é designado para denominar qualquer substância estranha ao organismo que não é utilizada como nutriente e que tem potencial tóxico para o organismo e que, portanto, deve ser excretada. Os xenobióticos podem ser produtos de processos químico-industriais, como um derivado de petróleo, um pesticida ou uma droga, tanto como veneno ou como remédio (MURRAY, 2007). Os organismos vivos estão em contato ao longo da vida com xenobióticos naturais (produtos do metabolismo secundário das plantas, toxinas de origem vegetal, animal ou fúngica) ou sintetizados.

A capacidade de as enzimas ligarem a determinados grupamentos químicos faz com que moléculas de poluentes antes inexistentes no organismo, os xenobióticos, se apresentem como substratos, que se absorvidos, interagem e alteram reações, levando algumas enzimas a desempenharem a catálise de reações chamadas de desintoxicação e de biotransformação. A modificação de uma molécula por meio de uma reação química catalisada por enzimas é denominada biotransformação, sendo que, geralmente, as substâncias sofrem transformação em metabólitos mais polares e menos lipossolúveis, o que poderá aumentar sua excreção e diminuir sua distribuição (CURCI, 2009). O processo de biotransformação de xenobióticos é chamado pelos bioquímicos de Metabolismo de Xenobióticos. Didaticamente, as reações químicas da biotransformação enzimática se classificam como reações de fase I e fase II (Figura 5).

As reações de fase I convertem a droga original em um metabólito mais polar por oxidação, redução ou hidrólise. Essas reações são responsáveis por expor ou introduzir grupos funcionais no xenobiótico, como hidroxila (-OH), amina (-NH₂), sulfidril (-SH) ou ácido carboxílico (-COOH). A reação mais frequente da fase I é a oxidação, catalisada principalmente pelos citocromos P-450, como também podem ser realizadas pelas monoamino-oxidases e pelas flavinas monooxigenases. As reduções são catalisadas por várias enzimas e também por processos não enzimáticos através de agentes redutores. As reações de hidrólise são catalisadas principalmente pelas epóxido hidrolases, como também pelas peptidases e pelas A-esterases.

Os produtos oriundos da fase I são mais polares, portanto mais hidrossolúveis, podendo ser excretados ou, ainda, sofrer biotransformação na fase II. As reações de fase II, que também se denominam reações de conjugação ou de síntese, implicam na união de uma droga ou de seu metabólito polar com um substrato endógeno como a glutatona (GSH), o sulfato, o acetato ou com um aminoácido (glicina, taurina e ácido glutâmico).

Figura 5 - Reações do metabolismo dos xenobióticos.



Além dos xenobióticos interagirem diretamente com moléculas do organismo, também podem alterar a concentração e a atividade das enzimas que metabolizam. Estas mesmas enzimas do metabolismo de xenobióticos participam, muitas vezes,

dos processos fisiológicos, como regulação hormonal, apoptose, metabolismo de proteínas e lipídios. Assim, a alteração das enzimas de biotransformação de xenobióticos afeta também a homeostase celular, podendo gerar doenças ou prejuízos fisiológicos.

Os peixes são capazes de metabolizar xenobióticos pela oxidação, pela redução e pela conjugação. As características cinéticas das enzimas de peixes ainda precisam ser estabelecidas, mas os ligantes substratos são semelhantes nos peixes e nos mamíferos. Por exemplo, geralmente as enzimas dos peixes necessitam de temperaturas mais baixas para ensaio do que as dos mamíferos, o que pode refletir as temperaturas normais mais comuns em heterotérmicos em comparação com homeotérmicos.

A mudança da atividade enzimática desencadeada durante a biotransformação de xenobióticos constitui, com frequência, uma resposta adaptativa reversível de um determinado organismo vivo a um dado composto, o que pode acelerar a sua modificação química e conseqüente eliminação (CANDEIAS, 2017). Conhecendo o nível médio da atividade de uma determinada enzima em condições saudáveis do organismo é possível identificar quando ocorre alteração, demonstrando que o ser vivo está sob alguma influência danosa. Com a mensuração da atividade de enzimas que catalisam reações do metabolismo de xenobióticos é possível inferir se os indivíduos de um determinado lugar estão afetados por algum poluente, bem como a capacidade que cada espécie possui para metabolizar os compostos com os quais está em contato, e por tal processo resistir à intoxicação.

É importante considerar que variáveis não diretamente relacionadas com a poluição também podem ter um impacto adicional sobre os diversos sistemas enzimáticos, aumentando ou diminuindo a atividade dos biomarcadores enzimáticos. Exemplos destas variáveis são a intercorrência de doenças nos organismos, se são machos ou fêmeas, sua idade, o estado nutricional, a atividade metabólica, seu comportamento migratório, seu status reprodutivo e de desenvolvimento, a densidade populacional, bem como fatores como a estação do ano, a temperatura ambiente e a heterogeneidade da poluição ambiental (VAN DER OOST et al., 2003). Alguns pesquisadores acreditavam que os peixes tinham um sistema de indução das enzimas de biotransformação menos efetivo que o de mamíferos, conseqüência de que os peixes, segundo eles, vivem em um ambiente em que os produtos tóxicos são diluídos,

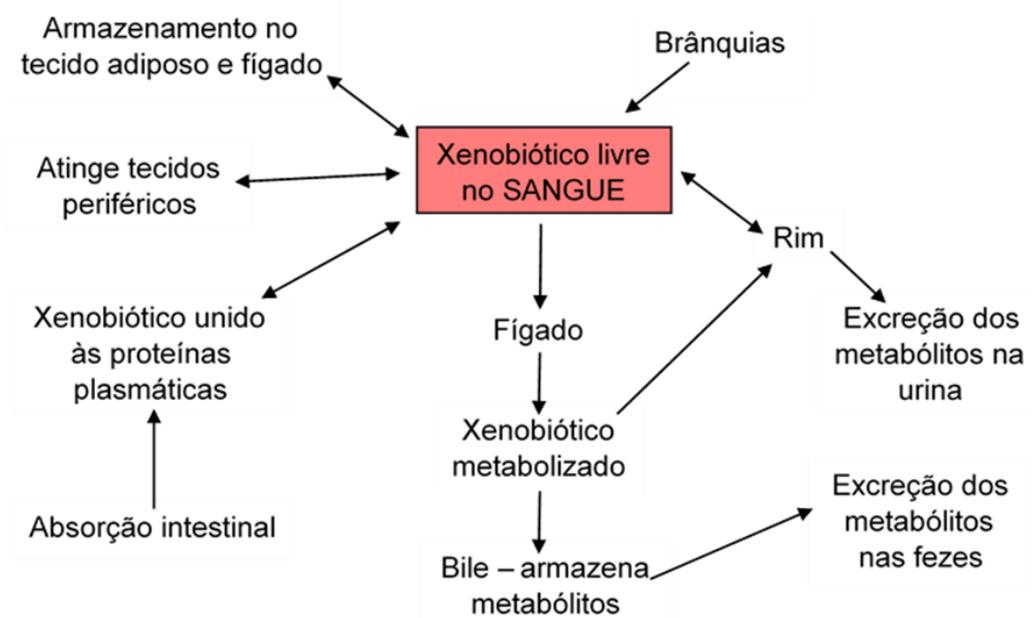
reduzindo assim a resposta das enzimas para transformar o xenobiótico (CHAMBERS e YARBROUGH, 1976).

Nos peixes, grande parte dos compostos pode ser facilmente absorvida pelas brânquias, pele ou trato gastrointestinal, sendo as brânquias a principal via de absorção porque possuem uma elevada superfície de contato e são órgãos de frequentes trocas de substâncias com o meio aquático (CANDEIAS, 2017). Os efeitos dos xenobióticos podem ser avaliados em diversos tecidos dos organismos, mas os sistemas enzimáticos responsáveis pela biotransformação de muitas substâncias estão localizados, principalmente, no retículo endoplasmático dos hepatócitos.

Quando o tecido hepático é homogeneizado e centrifugado, a maior parte das enzimas do retículo endoplasmático ficam no interior ou na membrana de pequenas vesículas microscópicas, conhecidas em seu conjunto como fração dos microssomos (CURCI, 2009). Estas enzimas também estão presentes em microssomos obtidos de outros órgãos como o rim, o cérebro, o coração, o pulmão e o epitélio gastrointestinal, ainda que em quantidades menores. Contudo, amostras do fígado são mais frequentemente utilizadas, visto que o fígado é o principal órgão envolvido no processo de biotransformação (MURRAY, 2007). Infelizmente, conseguir amostras de fígado implica, muito frequentemente, na morte do exemplar.

Xenobióticos absorvidos, seja pelas brânquias, pele ou intestino, são transportados para outros tecidos através da circulação sanguínea de onde podem passar para o interior dos eritrócitos (Figura 6), os quais, por isto mesmo, podem ser as primeiras células a sofrerem efeitos tóxicos (RUAS et al., 2008). Assim, também a utilização das células do sangue é importante para avaliação de alterações bioquímicas, não só porque podem ser obtidas sem a perda da vida do espécime, como por permitirem a avaliação do animal desde o início até o término de um experimento no laboratório, tornando-o um controle dele mesmo (SANTOS, 2013).

Figura 6 - Esquema geral da toxicocinética dos xenobióticos.



Fonte: Adaptado de Curci, 2009

Para humanos que são expostos ou possuem contato permanente com agrotóxicos, como os agricultores, o grau de intoxicação pode ser diagnosticado por meio de exame de sangue, que é obrigatório em alguns países. No Brasil esse procedimento já é feito em alguns poucos lugares (MOURA, 2007). Desta forma, é possível verificar se agricultores com baixos níveis de enzimas colinesterases ou alto de acetilcolina (substrato endógeno) estão sendo afetados e, portanto, devem ser afastados das suas funções de aplicador de agrotóxico até que os níveis voltem ao normal.

As atividades enzimáticas do metabolismo de xenobióticos foco deste estudo são apresentadas na Tabela 1 e são detalhadas no próximo tópico.

Tabela 1- Reações de biotransformação de xenobióticos verificadas neste estudo.

Fase	Reação	Enzima	Substrato	Amostra
I	Oxidação	CYP	Etóxirresorufina Etóxicumarina	Microssomos do fígado
I	Hidrólise	Carboxilesterase	4-nitrofenilacetato	Soro / plasma Microssomos do fígado
II	Conjugação	GST	Clorodinitrobenzeno	Fração do citosol do fígado

1.4 Atividades Enzimáticas

1.4.1 Mono-oxigenases citocromos P-450 (CYP)

O sistema de mono-oxigenação dependente de citocromo P-450 é o principal sistema enzimático envolvido na biotransformação por oxidação. Muitas oxidações da fase I de biotransformação dos xenobióticos em peixes podem ser mediadas pelos citocromos P-450 (CYP). CYP são uma família de proteínas presentes em frações celulares de membrana do retículo endoplasmático compondo o sistema das mono-oxigenases microsossomais (VAN DER OOST et al., 2003). Também são mono-oxigenases no metabolismo endógeno de moléculas de esteroides, ácidos graxos e colesterol.

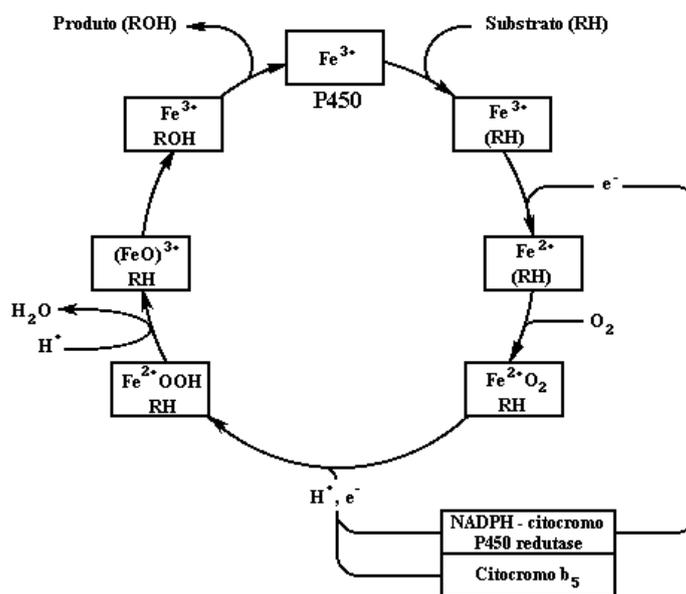
A capacidade que o citocromo P-450 tem de realizar reações com um grande número de substratos é decorrente da variedade de isoenzimas citocromo P-450 e da não especificidade de cada uma das isoenzimas para um substrato único. Esta variada especificidade provê importante flexibilidade ao metabolismo de xenobióticos. As famílias de cada forma de citocromo P-450 são denominadas por um numeral romano e as formas de maior interesse são as de I a IV, que por sua vez compreendem citocromos de várias subfamílias que são designados por uma combinação de uma letra (A, B, C, D, etc.) e um algarismo arábico para identificação.

A indução ou síntese “de novo” dos CYP é um dos biomarcadores bioquímicos melhor estudados. Diferentes isoformas de citocromo P-450 têm sido encontradas em diferentes espécies de peixes, sendo que a principal subfamília das isoenzimas do citocromo P-450 é a CYP1A. Os CYP1A são encontrados no fígado de animais aquáticos por meio do ensaio da atividade de EROD e de ECOD (CUNHA BASTOS, 2001; GOKSOYR e FÖRLIN, 1992).

A reação catalisada pelo citocromo P-450 é uma mono-oxigenação. Para tal, existe um sistema de transporte de elétrons acoplado com enzimas acessórias situado no retículo endoplasmático (GOKSOYR e FÖRLIN, 1992). As mono-oxigenações são aquelas oxidações nas quais um átomo de oxigênio molecular é reduzido pelos elétrons até água, enquanto o outro é incorporado a um substrato que resulta no

mono-oxigenado. O NAD reduzido (nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido) ou NADP reduzido (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido) participam como doadores de equivalentes de redução. A figura 7 esquematiza o ciclo catalítico de mono-oxigenação realizado pelo citocromo P-450. O substrato liga-se diretamente ao citocromo P-450 e ao oxigênio molecular, porém não consegue interagir diretamente com o NADP reduzido ou o NAD reduzido. Primeiro, um elétron é doado do NADP reduzido para o citocromo P-450, havendo redução do ferro do grupo heme do estado férrico (Fe^{3+}) para o estado ferroso (Fe^{2+}). O oxigênio pode então se ligar ao citocromo P-450 no estado ferroso e então receber um segundo elétron da NADPH redutase ou do citocromo b5. Após a entrada desse segundo elétron ocorre decomposição do complexo com a saída de uma molécula de água e o ferro retorna ao estado férrico. Como neste estado o ferro não se liga ao oxigênio, este é solto e transferido ao substrato. Assim, ocorre a liberação do substrato oxidado, havendo regeneração do estado de oxidação férrico do átomo de Fe^{3+} .

Figura 7 - Ciclo catalítico do citocromo P-450.



Fonte: Cunha Bastos, 2001.

Os CYP catalisam reações cujo processo comum é a oxidação por mono-oxigenação das moléculas dos xenobióticos. A presença de átomos de oxigênio na estrutura molecular, devido à sua eletronegatividade, provoca aumento da polaridade

do metabolito; substratos lipofílicos tornam-se produtos mais hidrofílicos. CYP podem ter sua função catalítica inibida ou ativada por drogas em situações diversas. Esta família de enzimas é extremamente importante, pois já foi calculado que aproximadamente 50% dos fármacos ingeridos por pacientes humanos são biotransformados por diferentes CYP, além de também agirem sobre carcinógenos e poluentes (MURRAY, 2007).

A indução do CYP1A tem sido caracterizada e envolve a ligação de xenobióticos, tais como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), bifenilas policloradas e as dioxinas ao receptor de aril hidrocarbonetos (KLEMZ et al., 2010). A atividade de CYP1A induzida nos peixes está relacionada com níveis de hidrocarbonetos aromáticos e policlorados no ambiente de uma forma dose-dependente, pois estudos demonstram que a correspondência entre a presença do receptor de hidrocarbonetos aromáticos e a indutibilidade CYP1A em peixes é bastante confiável (VAN DER OOST et al., 2003).

Geralmente, existem diferenças do CYP entre as espécies com relação ao conteúdo, ao grau de atividade e à susceptibilidade da enzima à indução. Estas diferenças podem ser verificadas considerando a fisiologia, habitats, comportamento, alimentação e também pela capacidade de captação, acumulação, distribuição e metabolização de contaminantes (KLEMZ et al., 2010). Segundo Gil e Pla (2001), as várias enzimas citocromo P-450 diferem substancialmente nas suas sequências de aminoácidos e, portanto, são susceptíveis de serem codificadas por genes distintos. Assim, estudos para estabelecer uma relação entre atividades específicas do citocromo P-450 e algumas doenças decorrentes da exposição a substâncias tóxicas ambientais são cada vez mais frequentes.

1.4.2 Esterases

As esterases são um grupo de enzimas capazes de hidrolisar ligações do tipo éster ou grupo amida de uma grande variedade de substratos produzindo um ácido carboxílico e um álcool ou um ácido carboxílico e uma amina. Estas enzimas são encontradas em vários tipos celulares em distintas localizações dentro da célula.

Algumas são exportadas para o plasma, outras estão na membrana celular, outras retidas em organelas, como no retículo endoplasmático, enquanto outras são encontradas solúveis no citoplasma (SATO, 2005). Possuem diversificadas funções fisiológicas, entre elas estão atividades proteolíticas e de lipases. Uma função das esterases no plasma humano é a diminuição de drogas, participando na ativação de fármacos ésteres, na inativação de drogas (por exemplo, relaxantes musculares, analgésicos, aspirina e cocaína) e na desintoxicação de venenos naturais e sintéticos contendo ligações ésteres (LI et al., 2005).

As esterases possuem ampla especificidade por vários substratos, realizando diversas funções próprias do organismo e agindo sobre xenobióticos que tenham estruturas similares aos compostos endógenos. Desta maneira, apresentam grande importância como desintoxicadoras. Algumas esterases plasmáticas e hepáticas podem reduzir os efeitos tóxicos de pesticidas agindo como “captadoras” ou “lixeriras”, pois ao serem inibidas, por ligarem em seus sítios ativos organofosfatos derivados de pesticidas organofosforados, evitam que organofosfatos alcancem sinapses nervosas e inibam funções do sistema nervoso. A captação é estequiométrica, assim, a eficácia destas esterases para desintoxicar depende de suas concentrações no sangue e da afinidade da enzima com o tóxico (SALLES, 2006).

Hayes (1994) agrupou as esterases em três categorias, baseando-se na sua reatividade com compostos organofosforados. As A-esterases hidrolisam preferencialmente ésteres que contêm grupamentos aromáticos presos ao carbono da carbonila e; ao interagirem com organofosfatos, os hidrolisam, sem ficarem fosfatadas. As B-esterases hidrolisam preferencialmente ésteres que contêm grupamentos alifáticos no carbono da carbonila e, ao hidrolisarem ésteres de organofosfatos são inibidas porque ligam firmemente nos seus centros ativos, após a hidrólise, a porção de fosfato do éster. As C-esterases são enzimas que preferem ésteres de acetato e não interagem com organofosfatos.

O grupo das B-esterases é composto pelas colinesterases (ChO) e carboxilesterases (CaE, EC 3.1.1.1). As enzimas colinesterases são a acetilcolinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) e a butirilcolinesterase (BChE, EC 3.1.1.8), seja o substrato sobre o qual possuem maior atividade de hidrólise, a acetiltiocolina ou a butiriltiocolina. As esterases sofrem inibição por fosfatos de organofosforados, pois a hidrólise do fosfato que fica ligado no sítio ativo durante a catálise é tão

demorada que tais fosfatos são ditos inibidores irreversíveis (FRAGA, 2010). Desta forma, as colinesterases têm sido amplamente usadas para avaliar os efeitos nocivos dos pesticidas e são difundidas como biomarcadores de exposição, porque possuem afinidade com compostos organofosforados e também com os carbamatos (ARIAS et al., 2007; GHAZALA et al., 2014; GIL e PLA, 2001; SALLES et al., 2006; VINCZE et al., 2015).

A AChE está presente, principalmente, nas fendas sinápticas, nas junções neuromusculares e na membrana das hemácias. Esta enzima hidrolisa melhor a acetilcolina do que a butirilcolina. A BChE está presente majoritariamente no fígado sendo, geralmente, secretada para o sangue e hidrolisa melhor a butirilcolina do que a acetilcolina. Para Gil e Pla (2001) o exemplo mais importante e útil de um biomarcador específico de neurotoxicidade é a inibição da AChE causada por compostos organofosforados e por carbamatos. Este biomarcador é usado na toxicologia humana e é amplamente estudado na ecotoxicologia em aves, mamíferos e espécies aquáticas.

Organofosfatos de organofosforados também podem ligar de forma irreversível a outras esterases não-alvo, por exemplo a CaE. Tal ligação faz a CaE atuar como uma enzima de desintoxicação, porque quando liga organofosfatos impede aumento da concentração do organofosfato no local em que está a colinesterase alvo. Desta forma, a CaE é capaz de alterar o perfil de toxicidade de alguns pesticidas que inibem as colinesterases (CHANDA et al., 1997). De acordo com Satoh (2005), a grande variedade de carboxilesterases encontradas em tecidos e no plasma mostram maior promiscuidade para os substratos que elas catalisam, assim, a multiplicidade de estrutura dessas enzimas permite hidrolisar uma gama diversificada de ésteres. Logo, esta esterase pode estar envolvida na proteção do organismo contra xenobióticos e ser interessante biomarcador.

Para o grupo das carboxilesterases não há tantos estudos relacionados com peixes e o biomonitoramento de ambientes aquáticos, por isso é um interessante campo de pesquisa, visto que novos compostos modificados de organofosforados e organoclorados estão sendo comercializados, já que muitos agrotóxicos baseados em fósforo e cloro são legalmente proibidos.

Carboxilesterases possuem em seu sítio catalítico a tríade de aminoácidos serina, histidina e glutamato. São proteínas ubíquas identificadas em variadas

espécies, desde bactérias ao homem, e, por demonstrarem atividade catalítica para uma variedade de substratos (acetiltiocolina, butiriltiocolina, alfa-naftil acetato, para-nitrofenil acetato, entre outros), sua nomenclatura e classificação são relativamente confusas (REDINBO E POTTER, 2005). Nos tecidos até agora estudados a maior concentração de CaE está no tecido hepático associada ao retículo endoplasmático ou a outras membranas. Em alguns animais a enzima CaE sofre uma ação proteolítica, desliga-se do retículo e é secretada para o plasma. Sua função no plasma ainda não foi determinada (FRAGA, 2010). Segundo Li et al. (2005), ratos, coelho, gato, tigre e cavalo possuem CaE no plasma, enquanto macaco, galinha, vaca, cabra, ovelha, porco e o homem não possuem CaE plasmática em quantidade detectável.

Estudos realizados com peixes verificaram atividade de CaE em sangue e fígado. Ribalta et al. (2015) compararam a atividade de CaE hepática basal de várias espécies de peixes do Mediterrâneo provenientes de diferentes profundidades e habitats, constatando que a atividade variou significativamente dependendo da espécie, do substrato para a reação e da fração celular usada (microssomal ou citosólica). Silva (2013) propõe que a atividade de CaE do soro de pacu possa ser um bom biomarcador de hipoxia, em qualquer época do ano, porque fica mais baixa em peixes sob hipoxia. Küster (2005) analisou a atividade de isoenzimas de colinesterases e carboxilesterases do peixe zebra (*Danio rerio*) nas primeiras 48 horas após a fertilização e os efeitos do metilparaoxon. Os resultados mostraram que a atividade da CaE foi cerca de 40 vezes maior do que as ChO nos estágios iniciais de desenvolvimento do *D. rerio*, apontando que a CaE pode servir como um sistema tampão estequiométrico de organofosforados nos primeiros estágios de desenvolvimento.

1.4.3 Glutathione S-transferase (GST)

As GST representam um numeroso grupo de isoenzimas da segunda fase do metabolismo dos xenobióticos e estão largamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas em bactérias, fungos, moluscos, insetos, plantas, peixes, pássaros e mamíferos. As GST são proteínas de uma família de enzimas que atuam conjugando

moléculas com a glutathione (GSH), um tripeptídeo endógeno altamente solúvel em água. Em geral, qualquer composto, seja ele um pesticida, fármaco ou substância endógena que possua em sua estrutura química um átomo eletrofílico, seja mais hidrofóbico que hidrofílico e que possa reagir não enzimaticamente com a GSH, serve de substrato para as glutathione S-transferases conjugarem-nos com a GSH (CUNHA BASTOS, 2001). O conjugado poderá ser excretado na bile ou metabolizado até a produção final de ácido mercaptúrico, que é dissolvido na urina (HABIG et al., 1974). Assim, estas enzimas apresentam função desintoxicadora ao catalisarem a conjugação de uma variedade de moléculas orgânicas endógenas e exógenas com o substrato endógeno GSH.

Outras evidências sugerem que além da proteção contra substâncias químicas de origem desconhecida, as GST estão envolvidas na proteção contra o estresse oxidativo. Se vários compostos potencialmente tóxicos não fossem conjugados com o GSH, ficariam livres para se conjugar com o ADN, o ARN ou com proteínas celulares, levando a sérios danos celulares (MURRAY, 2007). A ação conjunta de várias isoenzimas de GST pode compor como que uma rede de defesa do organismo contra as substâncias tóxicas ajudando na ação antitumoral, neutralização dos radicais livres provenientes do estresse oxidante ou mesmo ligar covalentemente alguns substratos, como hormônios, regulando sua ação no organismo (HAYES, 1989). Diferentes isoenzimas de GST exibem maiores atividades quando induzidas por um composto específico ou por um metabólito formado de um composto particular (CAMACHO et al., 2000). Desta forma, quando células absorvem xenobióticos, pode ocorrer aumento da expressão de uma dada classe ou mesmo de uma isoenzima específica de GST. Nestas situações, diferentes isoenzimas são encontradas expressas em diferentes espécies de animais e, conseqüentemente, os níveis de atividade destas isoenzimas podem ser investigados frente à exposição do animal a diferentes xenobióticos.

A maioria das GST citosólicas conhecidas foi purificada de órgãos de rato, de camundongos e de seres humanos. Elas estão distribuídas em doze classes baseadas em suas sequências de nucleotídeos, de aminoácidos, nas propriedades imunológicas, cinéticas e nas estruturas terciárias e quaternárias com que se apresentam (RODRIGUES, 2003). A atividade enzimática da glutathione S-transferase pode ser verificada com o uso de um substrato sintético, o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno

(CDNB). Este substrato serve para revelar a atividade geral da GST presente numa amostra, já que interage com quase todas as isoformas da enzima.

Bastos et al. (2013), após padronizarem a atividade de GST no citosol do fígado de tainhas, compararam os níveis sazonais desta atividade em duas lagoas contaminadas no Rio de Janeiro com as de uma baía de referência. As diferenças encontradas indicaram que as tainhas sofrem intoxicação subletal por contaminantes nessas lagoas e as variações sazonais da atividade foram relevantes. Assim, verificaram que os níveis de atividade padronizados de GST são biomarcadores úteis de contaminação ambiental para a tainha, uma vez que estas podem indicar diferenças dependendo da área de monitoramento e da estação do ano. Rodrigues (2003) estudou na sua tese GST hepáticas de diferentes peixes de água doce, padronizando a atividade enzimática para cada espécie, inclusive para o dourado.

1.5 Espécie alvo

O dourado, *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816), é classificado na família Characidae, ordem Characiformes. O *S. brasiliensis* possui ampla distribuição geográfica, sendo encontrado nas bacias dos rios Paraná, Paraguai, Uruguai, Alto rio Chaparé e Mamoré (dois últimos na Bolívia) e nas bacias ligadas ao sistema lagunar da Lagoa dos Patos. A revisão feita por Lima e Britski (2007) incluiu uma nova espécie para o gênero *Salminus* no Brasil: o *S. franciscanus*, que apresenta distribuição restrita à bacia do rio São Francisco. Existe ainda o *S. hilarii*, que é originário das bacias do Alto Rio Paraná, São Francisco, Tocantins e Alto Amazonas.

O dourado (Figura 8) é muito apreciado pelos pescadores esportivos, sendo uma espécie motivadora para o ecoturismo e um atrativo para estabelecimentos de pesque-pague. Na natureza vive solitário a maior parte do ano, realizando migrações em grupo no período reprodutivo durante a primavera e verão. Weingartner e Zaniboni Filho (2010) indicam duas principais razões que têm despertado interesse pelo *S. brasiliensis*: a) a preocupação com a conservação da espécie, que se encontra com estoques reduzidos em várias bacias hidrográficas sul-americanas; situação motivada principalmente pela ação antrópica e b) o seu potencial para piscicultura, pois, dentre

as espécies do gênero *Salminus*, esta é a que atinge o maior tamanho e cujo cultivo vem sendo mais intensamente estudado.

Figura 8 - Exemplar de dourado, *Salminus brasiliensis*.



Fonte: LAPAD, 2011.

Outro ponto para a escolha desta espécie é o fato que se encontra classificada como vulnerável na Lista Estadual de Espécies Ameaçadas de Extinção dos Estados do Rio Grande do Sul e do Paraná e como quase ameaçada no livro “A Fauna Ameaçada de Extinção no Estado de São Paulo: vertebrados”. No estado do Rio Grande do Sul está proibida a sua pesca, inclusive na bacia do rio Uruguai. Desta forma, existe uma grande mobilização no sentido de garantir a preservação do dourado, sendo necessário gerar informações que promovam com segurança sua sobrevivência, reprodução e cultivo.

Características do dourado, como a sua condição de espécie carnívora situada no final da cadeia alimentar, percorrendo grandes distâncias e ocupando diferentes habitats nas distintas fases da vida, fazem dele uma “espécie sentinela”, ou seja, uma espécie adequada para estudos de avaliação de qualidade de ecossistemas aquáticos de água doce (WEINGARTNER e ZANIBONI FILHO, 2010).

Estudos demonstraram elevadas concentrações de pesticidas organoclorados em peixes migratórios do rio Paraná, entre eles o dourado (MATSUSHITA e SOUZA, 1994). Cunha Bastos et al. (2004) ensaiaram a atividade de paraoxonase no soro de dourado e verificaram que a atividade desta enzima atingiu valores seis vezes maiores que os encontrados em soro de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e cascudo (*Hypostomus punctatus*), e 23 vezes maiores do que em soro de matrinxã (*Brycon cephalus*). A atividade enzimática da paraoxonase pode ser usada como um

biomarcador, uma vez que a enzima possui uma conformação propícia para hidrolisar o paroxon, a forma fosfato do paration, que é um ingrediente ativo usado largamente como inseticida organofosforado. A maior atividade catalítica da paraoxonase para o dourado é interessante, pois indica que esta espécie pode melhor hidrolisar alguns xenobióticos, evitando assim que atinjam órgãos vitais, podendo inibir colinesterases indispensáveis para a vida do animal.

2. OBJETIVO GERAL

Estudar atividades enzimáticas do peixe dourado, *Salminus brasiliensis*, como uma alternativa para biomonitorar ecossistemas aquáticos.

2.1 Objetivos Específicos

- Ensaiar atividades enzimáticas de isoenzimas mono-oxigenases dependentes do citocromo P-450 do fígado e da GST na fração solúvel do fígado de dourados com base nos protocolos existentes para esta espécie.
- Padronizar os ensaios da atividade de carboxilesterase do plasma e dos microsomas do fígado do dourado.
- Verificar se a atividade das enzimas muda do verão para o inverno.
- Estudar os efeitos da exposição do dourado a dois agrotóxicos, cujo os princípios ativos são o glifosato e o triflumuron, sobre tais atividades enzimáticas.
- Comparar o nível das atividades enzimáticas verificados no dourado com o de outras espécies.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Peixes

Os dourados da espécie *Salminus brasiliensis* foram obtidos através da parceria com o Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce (LAPAD) do Departamento de Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). O uso desses animais foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC conforme o ofício nº 105/CEUA/PROPESQ/2013 e o protocolo de número PP00788. Os animais que usamos do plantel eram adultos mantidos pelo LAPAD, que nasceram da primeira geração em laboratório proveniente de reprodutores selvagens capturados no alto rio Uruguai. Voucher dos exemplares estudados foram depositados na coleção ictiológica do Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina (MZUEL 7912).

3.2 Obtenção das amostras

Os peixes passaram por biometria antes da obtenção dos tecidos para análise, sendo medidos seu peso e comprimento. O sangue foi coletado por punção de um vaso do pedúnculo caudal com agulhas 25 x 0.6 mm e seringas de 5 mL, sendo o soro ou o plasma utilizado para os ensaios. O soro foi obtido deixando o sangue em repouso até a coagulação, seguido por centrifugação por 10 minutos a 3500 rpm. O sobrenadante consiste no soro usado, que foi mantido sempre resfriado em gelo picado e depois congelado até o momento da análise. O plasma foi obtido pelo uso de agulhas rinsadas com heparina para a coleta do sangue, seguindo centrifugação por 10 minutos a 3500 rpm para depositar os elementos figurados e obter o plasma sobrenadante cor de palha límpido.

Após a coleta do sangue alguns animais sofreram eutanásia por ruptura abrupta da coluna vertebral para a retirada de seus fígados. Os fígados foram rapidamente removidos e congelados em nitrogênio líquido até o momento de uso.

3.3 Preparo dos tecidos e dosagem de proteínas

Depois de descongelados, os fígados foram pesados e picados em um volume quatro vezes superior ao seu peso de solução tampão de fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0, contendo sacarose a 0,25 M. A homogeneização do tecido foi feita em um homogeneizador do tipo teflon-vidro (POTTER, 1936), sendo que o frasco de homogeneização contendo o tecido e a solução tampão foi mantido em gelo picado dentro de frasco de isopor. Núcleos, células inteiras e lisossomas, foram depositados a 12.000 x g por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi submetido a 105.000 x g por 90 min a 5 °C. O depósito resultante foi ressuspenso no tampão de homogeneização na relação de 1 mL de tampão por grama de fígado e passou a ser chamado de fração microssomal. A fração microssomal foi mantida em nitrogênio líquido até o uso. A fração sobrenadante da última centrifugação foi chamada de fração solúvel ou citosólica e foi guardada no freezer (-20 °C) até o momento do uso. Todas as etapas de fracionamento celular foram realizadas em uma ultracentrífuga refrigerada Hitachi modelo Himac CP80wx.

As concentrações de proteínas das amostras foram estabelecidas usando o método de Peterson (1977). Alíquotas de 2 µL de soro ou das frações do fígado foram elevadas a um mililitro com água destilada em um tubo de ensaio. Em acordo com a faixa de sensibilidade do método deve-se usar uma alíquota que contenha de 10 a 100 µg de proteínas totais. A seguir acrescentou-se 1 mL de reagente A, que é composto pela mistura de quatro componentes: a solução CTC (carbonato de sódio a 10%, tartarato duplo de sódio e potássio a 0,2% e sulfato de cobre a 0,1%), NaOH 3,2 M, dodecil-sulfato de sódio a 10% e água destilada na proporção de 1:1:1:1. Após vigorosa agitação as amostras foram deixadas em repouso por 10 minutos seguindo-se a adição do reagente B (Reativo de Folin e Ciocalteau e água destilada, na proporção de 1:5). Após 30 minutos de desenvolvimento da reação, a absorvância a

750 nm dos ensaios e brancos foi registrada no espectrofotômetro contra água destilada. Os brancos da reação não continham amostra. Para a construção da curva padrão utilizou-se 10 µg (P10) e 100 µg (P100) de albumina sérica bovina (BSA) no lugar da amostra. O cálculo da concentração proteica foi realizado segundo a equação:

$$\text{Proteína } (\mu\text{g}) = (I \times (\text{Abs} - \text{branco})) ^ S$$

Sendo:

$$S = \log 10 / \log (P100/P10)$$

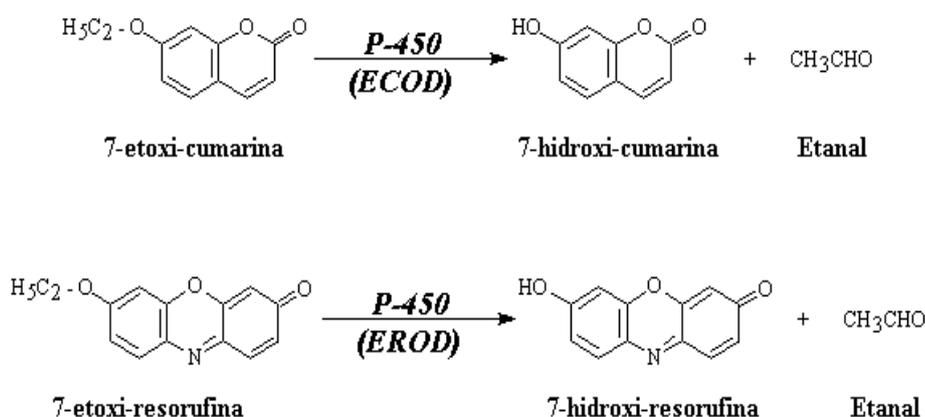
$$I = \text{antilog} ((\log 100/S) - \log P100))$$

3.4 Atividade enzimática do citocromo P-450

Foram ensaiadas duas atividades para diferentes isoenzimas do P-450. Uma é o ensaio de desetilação oxidativa do substrato 7-etoxicumarina (ECOD) lido para detectar a hidroxycumarina formada, pontualmente, por fluorescência em um fluorímetro Hitachi F-3010 com excitação a 368 nm e emissão a 456 nm (Figura 9). A outra atividade foi com o substrato 7-etoxirresorufina (EROD), sendo que a desetilação da resorufina foi medida continuamente em fluorímetro Hitachi F-3010 com excitação a 550 nm e emissão a 582 nm pelo aparecimento da hidroxirresorufina. (Figura 9).

As atividades enzimáticas de EROD e ECOD foram medidas usando amostras da fração dos microsossomos do fígado dos dourados. O protocolo seguido foi de acordo com o padronizado para espécies nativas de peixes do laboratório no qual foram realizados os ensaios.

Figura 9 - Esquema da reação enzimática da ECOD e da EROD.



Fonte: Cunha Bastos, 2001.

Para a atividade de ECOD, os ensaios com volume final de 500 μL foram preparados conforme indicado na tabela 2. Para a curva padrão foram usadas três quantidades de 7-hidroxycumarina tendo a BSA como proteína (ptn). Foram usados para cada ensaio 0,5 mg de proteínas da amostra. Os ensaios foram pré-incubados por 3 minutos em banho à 37 °C. A reação é iniciada nos tubos com amostra pela adição de NADPH, sendo os tubos mantidos por 15 minutos em banho à 37 °C. A reação é paralisada com 500 μL de ácido tricloroacético (TCA) a 5%. Os tubos são centrifugados por 15 minutos à 1500 rpm para depositar proteínas desnaturadas pelo TCA e 500 μL do sobrenadante são transferidos para outro tubo, que é levado ao espectrofluorímetro. Imediatamente antes da leitura acrescentam-se 2 mL de tampão glicina 1,6 M de pH 10,3 porque a 7-hidroxycumarina fluoresce neste pH.

O ensaio de EROD foi realizado pelo método cinético adicionando as soluções diretamente na cubeta para um volume final igual a 2 mL. Foi usada a solução tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8. A concentração da solução padrão de substrato etoxiresorufina foi de 0,5 mM, sendo colocados 10 μL no ensaio. Em seguida são adicionados 10 μL de MgCl_2 a 1 M, a fração microsossomal e o NADPH (20 μL de uma solução padrão de 25 mM) responsável pela partida da reação.

Para cada bateria de ensaios foi feita uma curva padrão com três pontos equivalentes a 10, 20 e 40 pmols de resorufina. Para tal, são adicionadas ao meio reacional as quantidades de 10, 20 ou 40 μL de uma solução padrão de resorufina na concentração de 1 μM .

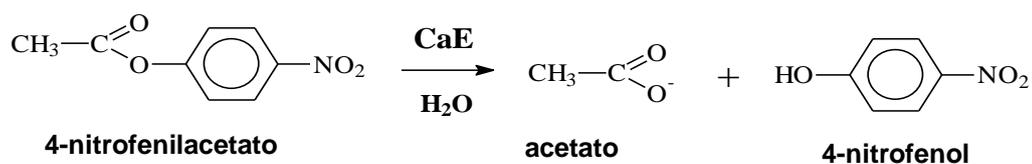
Tabela 2 - Protocolo para o ensaio de ECOD.

Soluções	Branco	Padrão 10 µL	Padrão 30 µL	Padrão 60 µL	Ensaio n
Tampão Tris 50 mM / HCl, pH 7,4	Ajuste 500 µL	Ajuste 500 µL	Ajuste 500 µL	Ajuste 500 µL	Ajuste 500 µL
Etoxicumarina 0,3 M em DMSO	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL
7-hidroxycumarina 1 µM em etanol	X	10 µL	30 µL	60 µL	X
MgCl ₂ 10 mM em água	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL
NADPH 25 mM em água	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL
BSA 1 mg/mL	0,5 µL de ptn	0,5 µL de ptn	0,5 µL de ptn	0,5 µL de ptn	X
Microsoma	X	X	X	X	0,5 mg de ptn

3.5 Atividade enzimática de esterases

Os ensaios de atividade da carboxilesterase foram realizados com soro, plasma e microsoma hepático utilizando como substrato o 4-nitrofenilacetato (4-NFA) de acordo com Morgan et al. (1994). A atividade enzimática foi medida pela determinação contínua do aparecimento do 4-nitrofenol durante um minuto no meio reacional no comprimento de onda de 400 nm em um espectrofotômetro Shimadzu UV-1800 (Figura 10).

Figura 10 - Esquema do ensaio da atividade enzimática da carboxilesterase.



Fonte: Salles, 2004.

A absorvância mensurada representa a soma da atividade catalisada e do aparecimento espontâneo de 4-nitrofenol na solução tampão de ensaio. Para registrar apenas a reação catalisada foi feito um branco que consiste no ensaio da atividade sem adicionar a amostra (tampão + 4-NFA). A atividade enzimática foi obtida pela subtração do valor de absorvância do branco do valor de cada ensaio.

Foram usados 10 μL da amostra por ensaio, sendo que no soro e no plasma as atividades enzimáticas foram expressas em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mL}^{-1}$. Nas frações do fígado a atividade foi expressa por $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína. Foi utilizado o coeficiente de absorvidade molar do 4-nitrofenol igual a $13.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

A reação foi realizada à temperatura ambiente em uma cubeta de volume final igual a 500 μL usando a solução tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,7. O substrato 4-NFA (PM = 181,1) foi diluído em acetonitrila e inicia a reação ao ser adicionado ao meio reacional. A concentração ótima de 4-NFA foi estabelecida pelos ensaios de padronização, sendo testados valores entre 0,15 e 48 mM. Com os dados dos ensaios de padronização foi calculada a constante cinética de Michaelis (K_M), através da fórmula da equação de Henri-Michaelis-Menten, a qual $v = \frac{V_{m\acute{a}x} \cdot [S]}{K_M + [S]}$. Sendo:

v – velocidade

$V_{m\acute{a}x}$ – velocidade máxima

S – Substrato

Também foi calculada a constante de velocidade de primeira ordem, que auxilia na observação da eficiência da enzima com substrato. Esta constante possui como símbolo o k_1 e é calculada pela divisão da velocidade máxima pela K_M , sendo expressa pela unidade de minutos⁻¹.

Ensaio de atividade colinesterásica foram realizados em algumas amostras para verificar se a atividade medida com o substrato 4-NFA não correspondia a AChE ou BChE. Os ensaios das colinesterases foram realizados de acordo com o método de Ellman et al. (1961), em um espectrofotômetro Shimadzu UV-1800 medindo a absorvância a 412 nm. Utilizou-se $14.150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ como coeficiente de absorvidade molar do ácido tionitrobenzóico.

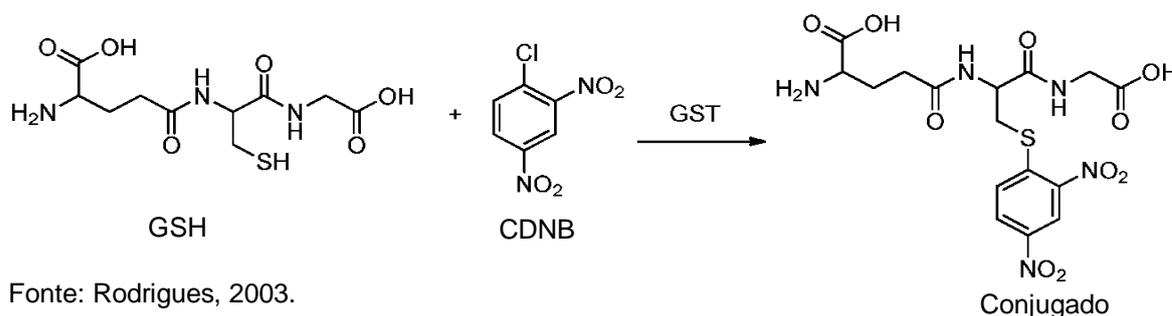
Os ensaios de AChE e BChE seguiram o protocolo padronizado para espécies nativas de peixes, tendo os seguintes parâmetros estabelecidos para cubetas de 200 μL : solução tampão fosfato de sódio a 0,1 M, pH 7,5, 20 μL de amostra, usando a

concentração final na cubeta de 1,875 mM de iodeto de acetiltiocolina ou iodeto de butiriltiocolina. O DTNB foi usado como reagente de cor na concentração de 0,32 mM. A leitura da absorvância ocorreu por 60 segundos de reação.

3.6 Atividade enzimática de GST

O ensaio de GST foi realizado com fração solúvel do fígado medindo o aparecimento do conjugado continuamente registrado por 3 minutos a 340 nm em um espectrofotômetro da marca Shimadzu UV-1800 (Figura 11). O substrato usado foi o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) que mede a atividade geral de GST.

Figura 11 - Esquema do ensaio da atividade enzimática da GST.



Fonte: Rodrigues, 2003.

A absorvância mensurada no espectrofotômetro representa a soma da atividade catalisada e da conjugação espontânea. Para registrar a conjugação química espontânea, não catalisada por enzimas, entre o CDNB e o GSH, foi feito o branco químico, que consiste no ensaio da atividade sem adicionar a fração solúvel que contém enzima. A atividade enzimática foi obtida quando o valor do ensaio foi subtraído do valor do branco.

Os parâmetros usados foram de acordo com a padronização realizada para a fração solúvel hepática de dourado por Rodrigues (2003). Em uma cubeta com volume final de 2 mL foram misturados a solução tampão de fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0, o substrato CDNB (2,5 mM final), a fração solúvel e o GSH (2 mM final), que é o responsável por iniciar a reação. O volume de fração solúvel variou para cada peixe,

sendo usado no ensaio o equivalente a 20 μg de proteína, obtida pela diluição em cerca de 100 vezes da fração solúvel.

Para cálculo das unidades de atividade em μmols de produto formado por minuto foi utilizado o coeficiente de extinção molar para o CDNB de $9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (HABIG et al., 1974) em acordo com a lei de Lambert-Beer. A atividade enzimática de GST foi expressa em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

3.7 Exposição dos peixes aos agrotóxicos *in vivo*

Adultos de dourado foram expostos a dois agrotóxicos para avaliar possíveis alterações das atividades enzimáticas. Doses e tempos de exposição foram testados, sendo coletadas amostras de sangue e o fígado para ensaiar, conforme relatado acima, as atividades enzimáticas.

Os peixes foram retirados do viveiro de terra e distribuídos em tanques redondos de alvenaria com 3.000 litros. Os tanques possuíam aeração e telas de cobertura. Em cada tanque foi adicionado o agrotóxico de acordo com o tratamento a ser testado, sendo que um grupo controle de seis peixes coletados diretamente do viveiro de terra foi considerado como controle.

Um dos agrotóxicos usados foi o inseticida comercialmente chamado de Certero[®], que possui como princípio ativo o triflumurom na proporção de 48%. Foram testadas duas doses na água: 0,025 e 0,1 ppm e dois tempos de exposição de 4 e 24 horas, sendo usados cinco animais por teste.

Outro experimento foi conduzido expondo dourados a um herbicida que continha o glifosato como princípio ativo (Mademato Plus[®] - 48%). A concentração de glifosato acrescentada na água foi de 1,5 ppm. Após quatro horas de exposição foram retirados cinco dourados; após 24 horas, três dourados.

Os experimentos de exposição foram realizados duas vezes; um durante o inverno e outro no verão. No experimento do verão também houve 48 horas de exposição e grupos controles de peixes mantidos em tanques de alvenaria apenas com água sem qualquer acréscimo. Cada tratamento continha cinco peixes e não foi possível coletar o fígado no experimento realizado no verão.

3.8 Ensaio *in vitro* com soro de dourado e xenobióticos

Ensaio em laboratório foram realizados buscando caracterizar a atividade enzimática encontrada no soro de dourado como sendo de uma carboxilesterase. Conjuntos de amostras de soro de vários dourados foram usados para testes com a presença de outros reagentes. Em alguns experimentos, o soro permaneceu em repouso à temperatura ambiente em tubos de ensaio com a solução tampão padrão da reação e um outro reagente. Tubos controles continham apenas soro e tampão; e tubos considerados como brancos continham solução tampão e o reagente em concentrações finais de acordo com cada dose testada.

A medição da atividade seguiu o descrito no item 3.5, sendo a reação disparada por acréscimo do substrato 4-NFA imediatamente antes do momento da leitura. Além dos agrotóxicos usados nos experimentos *in vivo*, foram testados ensaios com a presença de ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA), cloreto de potássio (KCl) e eserina.

3.9 Semipurificação de carboxilesterase do soro de dourados

O protocolo para purificação de carboxilesterase de soro seguido foi de acordo com o apresentado por Fraga (2010), que adaptou o método de Salles et al. (2006) usado para isolar butirilcolinesterase do soro do peixe piaçu (*Leporinus macrocephalus*).

A semipurificação foi realizada com um *pool* de soro obtido de seis dourados. O volume final do pool foi de 3 mL, que foi diluído em igual volume de solução tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0. Inicialmente, esta mistura foi filtrada numa seringa com filtro millipore de 0,45 µm para retirar impurezas.

A primeira etapa da semipurificação consistiu no uso da coluna de afinidade HiTrap Blue HP da GE Healthcare de 5 mL, contendo o ligante Cibacron Blue F3G-A

na matriz de Sepharose. A HiTrap Blue é apropriada para isolar albumina, interferon, fatores de coagulação e proteínas que requerem nucleotídeos. Neste estudo, a coluna foi utilizada com a finalidade de fixar a albumina presente no soro.

Esta coluna é equilibrada com solução tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0. O soro foi passado pela coluna e frações de 2 mL foram coletadas manualmente a cada dois minutos. Para cada tubo foi feita a leitura pontual em 280 nm para verificar a presença de proteínas. A primeira fração coletada da coluna é a de interesse, pois as esterases não ficam retidas na coluna. Em seguida, a fração albumina foi eluída da coluna com a mesma solução de equilíbrio acrescida de KCl 1,5 M. Na fração não ligada a HiTrap Blue foi quantificado o total de proteínas e ensaiada a atividade de CaE como descrito nos itens 3.3 e 3.5.

Na segunda etapa da semipurificação, o volume conjunto dos tubos que continham atividade de CaE obtidos da HiTrap Blue foi concentrado em SpeedVac® e aplicado numa coluna de 3 mL de Sepharose 4B-procainamida equilibrada com solução tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,5, contendo NaCl 0,1 M e EDTA 1 mM. A coluna foi então lavada com a mesma solução tampão até que no eluato não se pudesse detectar proteínas a 280 nm. A fração colinesterásica foi eluída com 6 mL de solução de procainamida 0,02 M e 4 mL de solução procainamida 0,05 M. Alíquotas de 1 mL coletadas manualmente foram imediatamente lidas em espectrofotômetro a 280 nm, sendo quantificada a proteína total e ensaiada a atividade de CaE como descrito nos itens 3.3 e 3.5. Esta etapa de cromatografia de afinidade em Sepharose 4B-procainamida visa reter as colinesterases da amostra, uma vez que estas possuem afinidade pela coluna, enquanto as carboxilesterases passam livremente.

A etapa final consistiu na remoção de contaminantes proteicos e de procainamida através da filtração em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para isto, todo o conteúdo dos tubos contendo as frações enriquecidas com atividade de CaE foram aplicados numa coluna de exclusão para CLAE Shim-pack Diol-150-Shimadzu 7,9 mm x 25 cm equilibrada com solução tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,5, contendo EDTA 0,001 M. O fluxo da coluna foi de 1,5 mL min⁻¹ e a eluição das proteínas foi acompanhada no comprimento de onda de 280 nm. Os eluatos de cada tubo foram coletados manualmente. O volume de cada tubo que continha atividade de CaE foi previamente concentrado no SpeedVac® e ressuspensão em 200 µL de água ultrapura. Em cada tubo foi verificada a atividade de CaE e das

colinesterases conforme descrito no item 3.5 e feita a dosagem de proteína. As amostras que apresentaram atividade foram mantidas congeladas para futuras análises.

3.10 Eletroforese

Para verificar a homogeneidade da amostra após a semipurificação e obter o peso molecular, os picos coletados no CLAE com atividade de CaE sobre 4-NFA foram analisados em gel de poliacrilamida desnaturante (gel SDS-PAGE). A eletroforese foi realizada no Laboratório de Toxinologia – LATOX, que é responsável pela plataforma tecnológica de proteômica da Fiocruz do Rio de Janeiro.

O gel de corrida foi de 12% e o gel de estocagem 4%, sendo montados em placas de vidro com 0,75 mm de espessura. As amostras foram misturadas ao tampão de amostra e submetidas à fervura por 5 minutos antes da aplicação. A eletroforese foi realizada a 200 volts durante 1 hora e 30 minutos. As proteínas foram fixadas no gel em uma solução de 40% etanol + 10% ácido acético e reveladas com o corante Comanssie Blue.

3.11 Análise dos dados

As análises estatísticas e os gráficos foram feitos usando o software Excel e o programa GraphPad Prism for Windows (GraphPad Software, La Jolla California - USA). Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão. Para verificar a existência de diferenças estatísticas foram utilizadas análises de variância. Verificada diferença, testes adequados para cada caso foram aplicados para a separação das médias.

4. RESULTADOS

Foram realizadas coletas no verão e no inverno de dourados mantidos em viveiro de terra com o objetivo de padronizar os ensaios enzimáticos e estabelecer os níveis basais das atividades enzimáticas. As características físico-químicas dos viveiros são apresentadas na Tabela 3. Para os ensaios com intuito de estabelecer a atividade basal foram coletados 30 dourados adultos, que tinham em média 1502 ± 395 gramas e $48,97 \pm 5,71$ centímetros de comprimento.

Tabela 3 - Características físico-químicas dos viveiros de terra.

Estação	Temperatura ar	Temperatura água	pH	Oxigênio dissolvido
Verão	31,0 °C	30,0 °C	7,0	7 mg/L
Inverno	15,0 °C	20,5 °C	7,2	6 mg/L

4.1 Atividades enzimáticas do citocromo P-450

Os resultados obtidos dos ensaios da atividade de desetilação oxidativa na fração dos microsossomos dos fígados dos dourados usando etoxicumarina (ECOD) e etoxirresorufina (EROD) são apresentados na tabela 4. Nota-se que a atividade do ensaio de ECOD alcançou valores aproximadamente 13 vezes maiores do que os obtidos para EROD.

Tabela 4 - Atividade média do citocromo P-450 em fígado do dourado, *S. brasiliensis*, para desetilar etoxicumarina (ECOD) e etoxirresorufina (EROD).

Atividade em microsossomos do fígado de <i>S. brasiliensis</i>	pmol min ⁻¹ mg ⁻¹ ptn
ECOD	$33,74 \pm 21,16$
EROD	$2,45 \pm 0,78$

Para obter algum valor detectável no ensaio de EROD foi preciso ajustar o ensaio padronizado para peixes nativos no laboratório de bioquímica toxicológica da UERJ. Foi necessário adicionar mais que o dobro de amostra de fração dos microsomos indicada, aumentando a quantidade de proteína no ensaio. Nos ensaios de EROD foram usados em média $9,49 \pm 2,34$ mg de proteína, enquanto que no ensaio de ECOD foram usados 0,5 mg. Um ensaio de controle positivo da EROD realizado com microsossoma hepático de duas tilápias oriundas da Lagoa Rodrigo de Freitas mostrou atividade de $99,86 \pm 0,43$ pmol min⁻¹ mg⁻¹ ptn, demonstrando a eficiência do protocolo de ensaio para peixes.

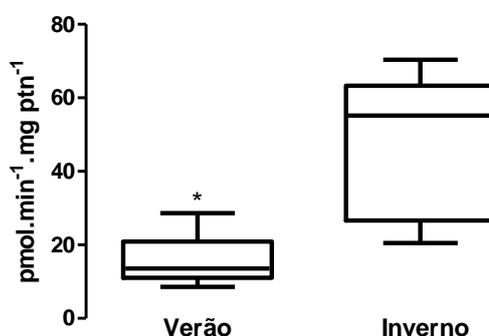
Não foi verificada diferença estatísticas (teste-t, 95%) para a atividade sazonal de EROD ($P = 0,077$), conforme demonstrado na tabela 5. Porém, a atividade de ECOD no verão foi menor do que a do inverno, conforme demonstrado na Figura 12.

Tabela 5 – Atividade sazonal do citocromo P-450 em fígado do dourado, *S. brasiliensis*, para desetilizar etoxicumarina (ECOD) e etoxirresorufina (EROD).

Estações	ECOD	EROD
	pmol min ⁻¹ mg ⁻¹ ptn	pmol min ⁻¹ mg ⁻¹ ptn
Verão	$21,77 \pm 15,69$	$2,70 \pm 0,84$
Inverno	$47,70 \pm 18,23^*$	$2,20 \pm 0,65$

Legenda: *diferença significativa pelo teste t ($P < 0,0001$)

Figura 12 - Atividade sazonal do citocromo P-450 em fígado do dourado, *S. brasiliensis*, para desetilizar etoxicumarina (ECOD).



Legenda: *diferença significativa pelo teste t ($P < 0,0001$)

Na tabela 6 são apresentados valores obtidos para atividades de CYP em outras espécies de peixes, demonstrando que o dourado apresenta valores inferiores

de EROD quando comparado ao pacu e a tilápia. A atividade de ECOD do dourado foi maior do que a do pacu, mas menor do que a registrada para tilápia e cascudo.

Tabela 6 - Atividade do citocromo P-450 em fígado de peixes para desetilizar etoxicumarina (ECOD) e etoxirresorufina (EROD).

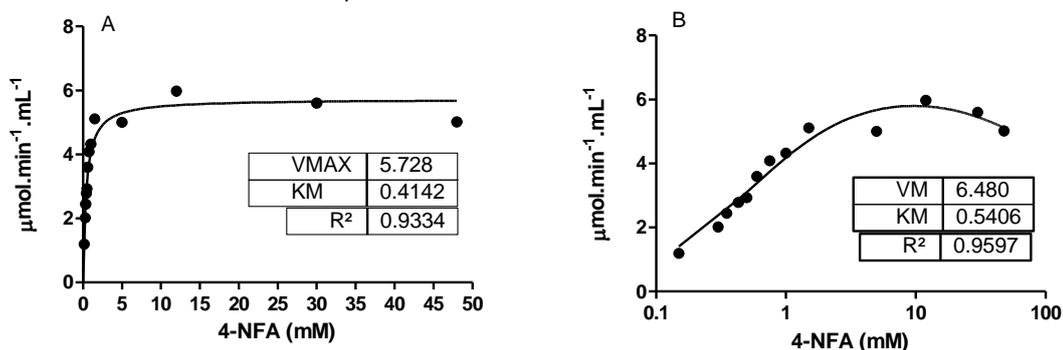
Espécies	pmol min ⁻¹ mg ⁻¹ ptn		Referência
	ECOD	EROD	
Dourado (<i>Salminus brasiliensis</i>)	33,74 ± 21,16	2,45 ± 0,78	Este trabalho
Pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>)	8,05 ± 2,22	18,82 ± 9,97	Cunhas Bastos, 2001
Tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	81,25 ± 16,8	43,44 ± 19,1	Martins, 2008
Cascudo (<i>Hyposthomus luetkeni</i>)	494,63 ± 294	ND	Martins, 2008

ND = não detectado.

4.2 Atividade enzimática de esterases

Na primeira etapa, tendo como base o ensaio enzimático de CaE para o soro de pacu padronizado por outros pesquisadores do laboratório (SILVA, 2013), determinou-se a quantidade adequada de substrato (4-NFA) para os ensaios com o soro de dourados. A partir de um *pool* de soro dos animais, estabelecemos como a variação da concentração de 4-NFA afeta a velocidade inicial da catálise a 25 °C durante 60 segundos de reação e determinamos a $V_{m\acute{a}x}$ para o substrato, assim como o valor da K_M aparente (Figura 13).

Figura 13 - Variação das concentrações de 4-NFA sobre a velocidade inicial da atividade de CaE em soro do dourado, *S. brasiliensis*.



Legenda: A) curva de Michaelis-Menten, B) curva de Radic-Taylor.

A partir das curvas obtidas escolhemos ensaiar a atividade de CaE por um minuto usando 5 mM de 4-NFA na cubeta contendo 10 μ L de soro e 500 μ L de volume final de reação.

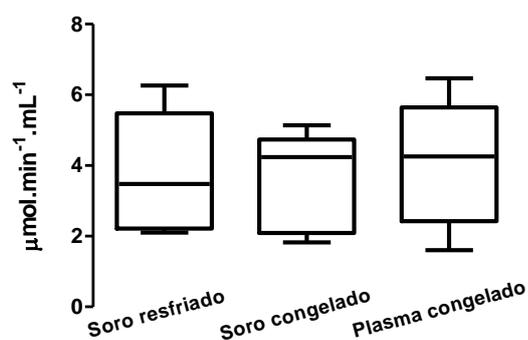
Comparando os resultados verificou-se que os dados para o dourado são similares aos obtidos para o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e que os valores das K_M da atividade do soro de ambos sugerem que seus soros tem uma atividade mais propícia para hidrolisar o 4-NFA do que as atividades do plasma de outros peixes nativos, conforme apresentado na Tabela 7. O curimbatá (*Prochilodus lineatus*) apesar de possuir maior K_M do que o dourado e o pacu, apresenta uma $V_{m\acute{a}x}$ aproximadamente seis vezes maior, o que aumenta sua eficiência enzimática.

Tabela 7 - Valores aparentes da K_M e da $V_{m\acute{a}x}$ de hidrólise de 4-NFA por *pool* de soro de peixes neotropicais.

Espécie	4-NFA			Referência
	K_M (mM)	$V_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$)	$V_{m\acute{a}x}/K_M$ $\hat{k}_c(\text{min}^{-1})$	
Dourado (<i>Salminus brasiliensis</i>)	0,41	5,73	13,97	Este trabalho
Curimbatá (<i>Prochilodus lineatus</i>)	0,84	29,85	35,53	Fraga, 2010
Pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>)	0,48	4,69	9,77	Fraga, 2010
Piauçu (<i>Leporinus macrocephalus</i>)	1,37	2,33	1,70	Fraga, 2010

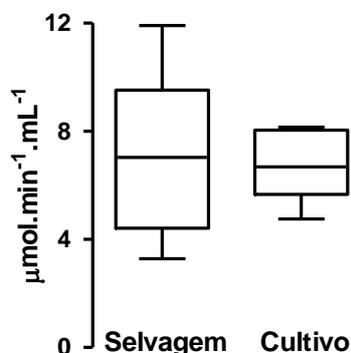
Buscando conferir a estabilidade da enzima depois do soro coletado, armazenado e levado até o laboratório, a atividade da CaE foi testada em alíquotas de soro mantido resfriado, soro e plasma congelados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figura 14). Para tal, foram usados seis exemplares e não foi verificada diferença estatística entre as diferentes formas de armazenamento ($P = 0,81$). Foi usado soro resfriado e soro descongelado apenas uma vez. Após a realização deste teste, passou-se a congelar o soro após a coleta, uma vez que possibilita o armazenamento das amostras por períodos maiores com menor chance de contaminação do soro por micro-organismos e sem alteração na atividade enzimática.

Figura 14 - Atividade de CaE do dourado, *S. brasiliensis*, em duas formas de armazenamento do plasma e do soro ($n = 6$).



A média da atividade de CaE do soro de seis dourados de cultivo foi comparada com resultados obtidos de seis peixes selvagens provenientes do Pantanal em 2009 (Figura 15). A média da atividade de CaE nos soros dos dourados selvagens foi $7,24 \pm 2,82\text{ }\mu\text{mol min}^{-1}\text{ mL}^{-1}$ e nos soros dos dourados de cultivo foi de $6,72 \pm 1,17\text{ }\mu\text{mol min}^{-1}\text{ mL}^{-1}$, indicando que não houve diferença (teste t, 95%) entre as médias de atividade ($P = 0,60$).

Figura 15 – Comparação da atividade de CaE em soro do dourado, *S. brasiliensis*, selvagem *versus* cultivo (n = 6).



A média da atividade enzimática de CaE no soro dos dourados de cultivo foi de $6,96 \pm 3,71 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$. O cálculo do intervalo de confiança desta atividade indicou que o $\text{IC}_{95\%} = [5,85; 8,02] \mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$. Não foi verificada diferença sazonal ($P = 0,188$) na atividade de CaE no soro quando calculada por mL (Tabela 8). Porém, foi observada diferença entre as estações quando a atividade é expressa por mg de proteína ($P < 0,0001$), conforme demonstrado na Tabela 8.

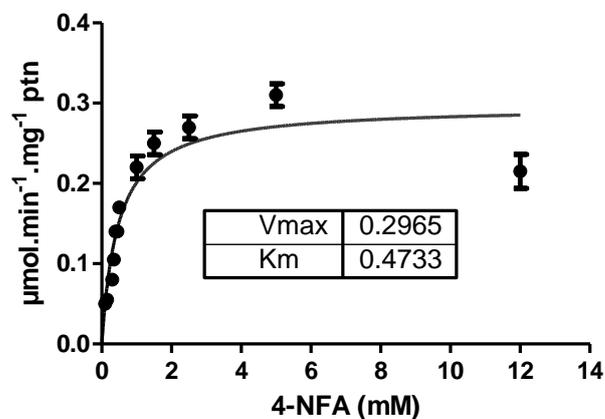
Tabela 8 - Atividade sazonal de CaE do dourado, *S. brasiliensis*.

Estações	CaE soro	CaE soro	CaE fígado
	$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$	$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{ptn}$	$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{ptn}$
Verão	$5,82 \pm 2,70$	$0,44 \pm 0,08^*$	$0,15 \pm 0,02$
Inverno	$6,94 \pm 1,60$	$0,12 \pm 0,03$	$0,24 \pm 0,05^*$

Legenda: *diferença significativa pelo teste t ($P < 0,05$) entre verão *versus* inverno.

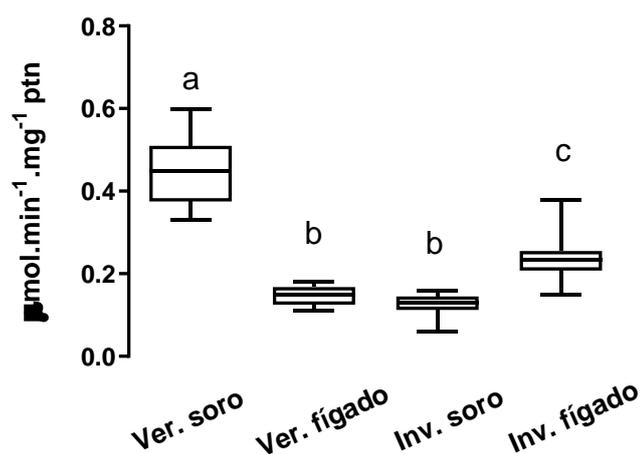
Para ensaiar a atividade de CaE nos microsossomos do fígado dos dourados de cultivo também foi escolhido 5 mM de substrato 4-NFA, após realizada a curva de padronização (Figura 16). A atividade média de CaE hepática encontrada foi $0,22 \pm 0,07 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{ptn}$. Nesta análise foi verificada diferença sazonal, tendo uma elevação da atividade no inverno quando comparada ao verão (Tabela 8).

Figura 16 - Variação das concentrações de 4-NFA sobre a velocidade inicial da atividade de CaE em microsomas do fígado do dourado, *S. brasiliensis*, pela curva de Michaelis-Menten.



Outra relação interessante verificada é a comparação da atividade de CaE do soro expressa por mg de proteína com a dos microsomas do fígado no inverno e no verão (Figura 17). No verão, a atividade de CaE tende a ser maior no soro do que no fígado, enquanto que no inverno esta relação é invertida.

Figura 17 - Variação sazonal por mg de proteína da atividade de CaE em soro e fígado do dourado, *Salminus brasiliensis*.

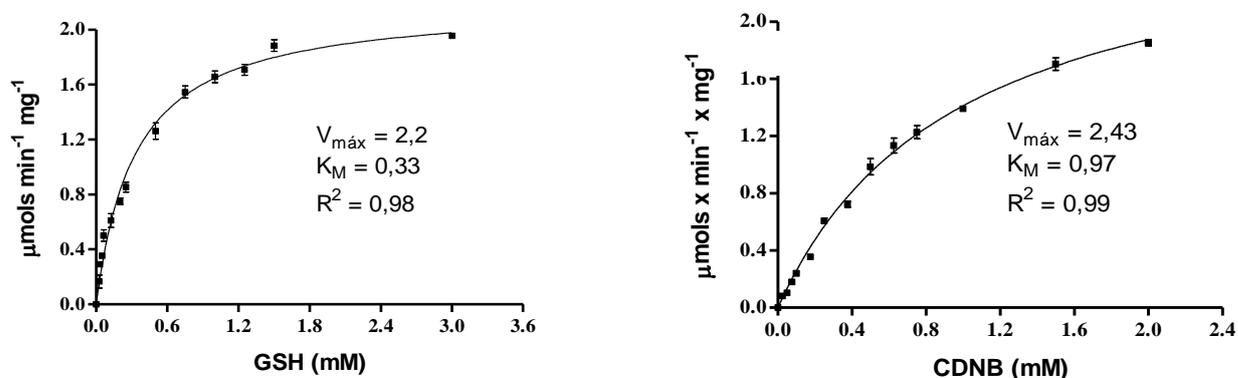


Legenda: a, b, c indicam diferença significativa pela ANOVA seguido de Tukey.

4.3 Atividades enzimáticas da GST

A atividade de GST sobre o substrato CDNB na fração solúvel hepática dos dourados de cultivo foi em média $2,31 \pm 0,70 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{ptn}$. A figura 18 demonstra que a melhor concentração de CDNB para ensaiar a atividade de GST foi 2,5 mM e para o GSH foi 2,0 mM.

Figura 18 - Variação da atividade de GST na fração solúvel do fígado do dourado, *S. brasiliensis*, pela curva de Michaelis-Menten.



Não foi verificada variação sazonal significativa ($P = 0,993$), conforme demonstrado na Figura 19. Para comparar a atividade de GST do dourado, a tabela 9 mostra atividades médias de diferentes espécies de peixes.

Figura 19- Atividade de GST sobre CDNB presente em fração solúvel de fígado do dourado, *S. brasiliensis*.

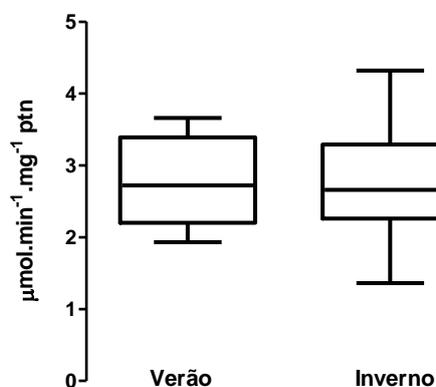


Tabela 9 – Atividade de GST sobre CDNB em fração solúvel de fígados de peixes.

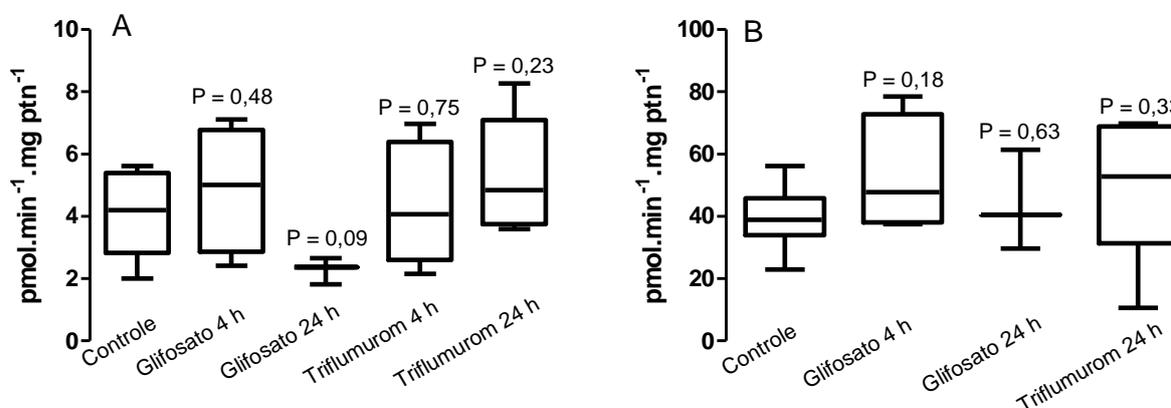
Espécies	$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{ptn}$	
	GST	Referência
Dourado (<i>Salminus brasiliensis</i>)	2,31 \pm 0,70	Este trabalho
Pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>)	1,60 \pm 0,03	Rocha-Santos, 2018
Matrinã (<i>Brycon cephalus</i>)	0,65 \pm 0,02	Rodrigues, 2003
Cascudo (<i>Hypostomus punctatus</i>)	0,51 \pm 0,02	Rodrigues, 2003
Tainha (<i>Mugil sp.</i>)	2,8 \pm 0,09	Bastos et al., 2013

4.4 Exposição *in vivo* dos dourados aos agrotóxicos

Com relação ao experimento de exposição dos dourados aos agrotóxicos realizado no inverno foram verificadas algumas alterações, porém ocorreu um erro na distribuição dos peixes nos tanques; o que prejudicou a análise dos resultados. Cada tanque deveria ter cinco peixes, mas o tanque correspondente ao tratamento com glifosato 24 horas ficou apenas com três e outros tratamentos ficaram com seis dourados. Também não foi possível ensaiar algumas atividades no fígado para o tratamento com triflumurom. Por isso, o experimento foi repetido no verão visando igualar o número de peixes por tratamento e inseriu uma análise do tratamento controle para cada tempo de exposição (4, 24 e 48 horas).

No experimento do inverno foi possível coletar o fígado dos animais e o grupo controle escolhido foi o de dourados coletados diretamente do viveiro de terra. As atividades de CYP aparentemente sugerem um aumento nos dourados expostos a 0,1 ppm de triflumurom durante 24 horas (Figura 20), porém esta diferença não foi estatisticamente comprovada. Também não foi observada diferença para o grupo exposto ao glifosato.

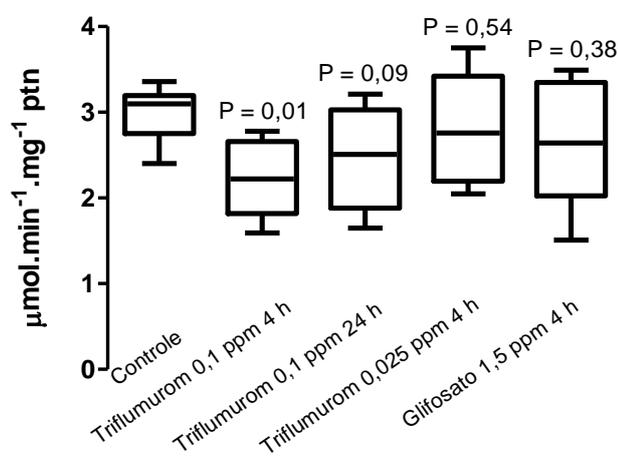
Figura 20– Atividade de CYP na fração dos microsossomos do fígado do dourado, *S. brasiliensis*, após exposição na água de 0,1 ppm de triflumurom e 1,5 ppm de glifosato.



Legenda: A) EROD e B) ECOD. Teste t entre controle *versus* tratamento, $P > 0,05$.

Com relação a atividade enzimática de GST hepática apenas foi verificada diminuição estatisticamente significativa pelo teste t ($P = 0,0109$) entre o grupo controle e os dourados expostos a 0,1 ppm de triflumurom nas primeiras 4 horas (Figura 21). Todos os demais tratamentos não tiveram atividade significativamente alterada quando comparados com o grupo controle (teste-t, 95%, entre controle *versus* tratamento).

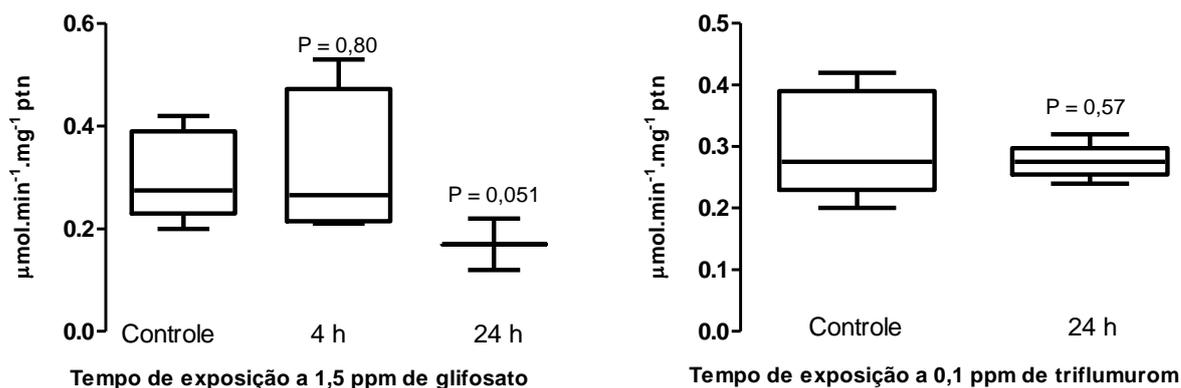
Figura 21 - Atividade de GST na fração solúvel do dourado, *S. brasiliensis*, após exposição a agrotóxicos na água.



Legenda: Teste t 95% entre controle *versus* tratamento.

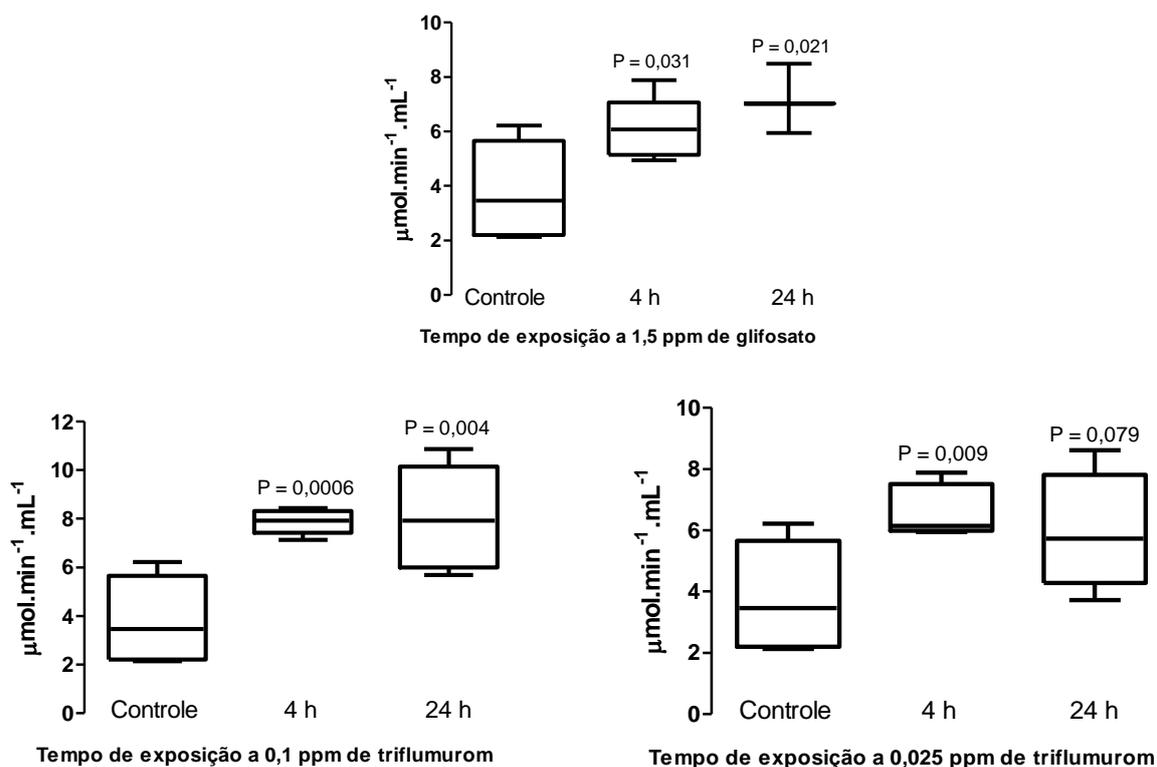
A atividade de CaE nos microsossomos do fígado dos dourados expostos aos agrotóxicos também não teve alteração significativa (Figura 22). Porém, foi verificado aumento da atividade da CaE no soro dos peixes expostos ao glifosato e ao triflumurom em ambas as doses aplicadas e tempos de exposição (Figura 23).

Figura 22- Atividade de CaE na fração dos microsossomos do fígado do dourado, *S. brasiliensis*, após exposição a agrotóxicos na água.



Legenda: Teste t 95% entre controle *versus* tratamento, $P > 0,05$.

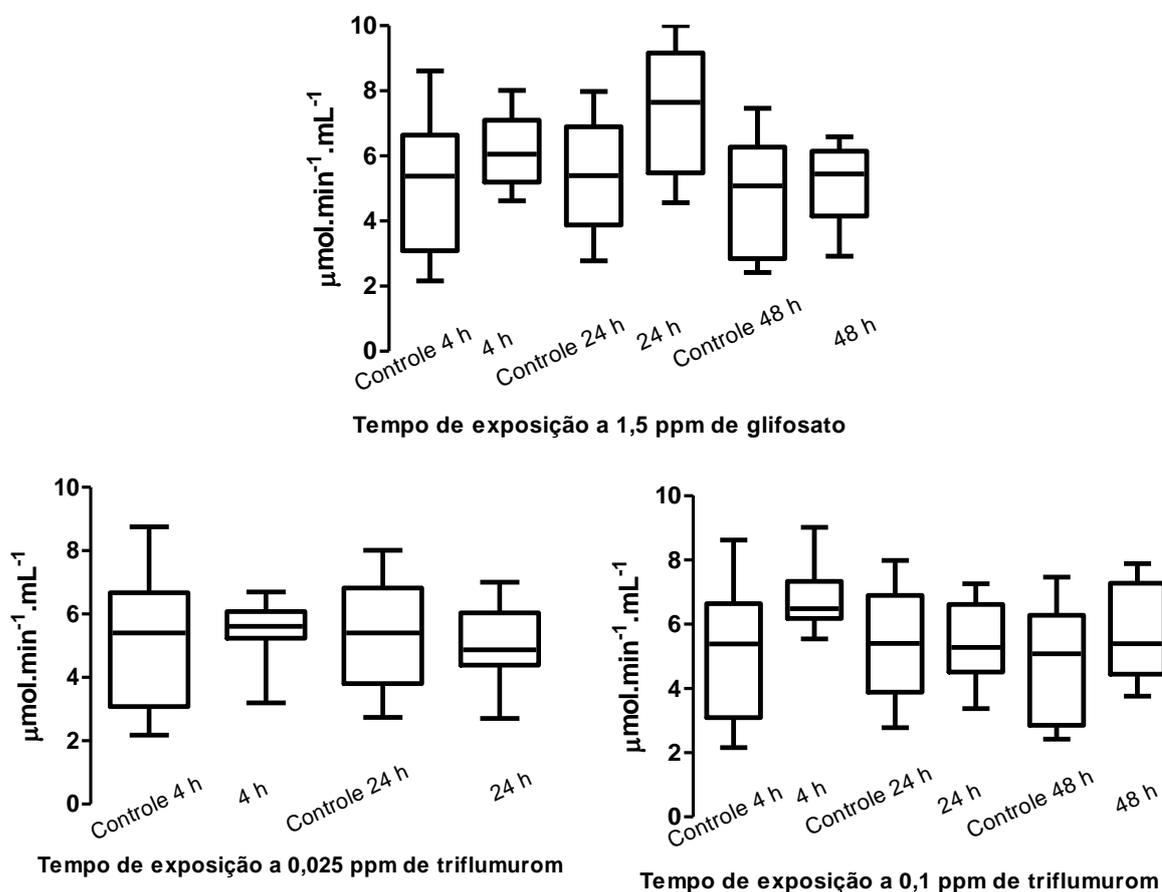
Figura 23 – Atividade de CaE no soro do dourado, *S. brasiliensis*, após exposição aos agrotóxicos na água no experimento do inverno.



Legenda: Teste t 95% entre controle *versus* tratamento.

No experimento no verão buscou-se minimizar possíveis diferenças na atividade enzimática que poderiam ser provocadas por outros fatores que não a presença do agrotóxico. Por exemplo, o estresse devido ao espaço reduzido. Também foi usado o mesmo grupo de peixes durante todo o experimento, sendo coletado um pouco de sangue dos mesmos peixes a cada hora de exposição determinada. Com este desenho experimental, não foi verificada variação significativa na atividade de CaE no soro dos dourados nas doses e tempos testados quando comparado o grupo controle de cada hora de coleta com o grupo exposto aos agrotóxicos (Figura 24).

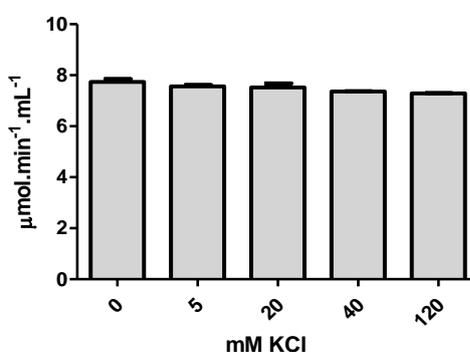
Figura 24 – Atividade de CaE no soro do dourado, *S. brasiliensis*, após exposição aos agrotóxicos na água no experimento do verão.



4.5 Ensaio *in vitro* com soro de dourado e xenobióticos

A qualidade do soro obtido entre os animais pode variar; enquanto alguns são lípidos, outros estão com resíduos de hemácias. As hemácias com o tempo se hidrolisam liberando o conteúdo do seu interior que contém potássio. Assim, testes *in vitro* foram realizados para verificar se a presença do potássio no meio reacional altera a atividade enzimática de hidrólise do 4-NFA no soro de dourado. Ensaio foram feitos com a presença de concentrações entre 5 e 120 mM de cloreto de potássio (KCl). Não foi verificada alteração significativa na atividade (Figura 25), demonstrando que o potássio não interfere na reação de hidrólise.

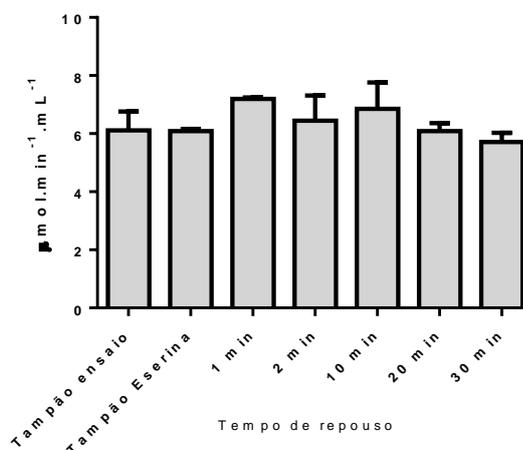
Figura 25 – Atividade de CaE sobre 4-NFA no soro do dourado, *S. brasiliensis*, com a presença de KCl no meio reacional.



Legenda: Mann Whitney teste t, controle *versus* tratamento, $P > 0,05$.

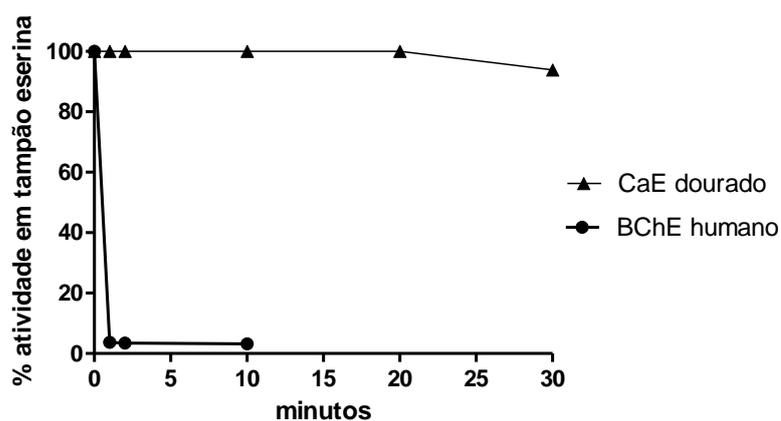
Outro ensaio *in vitro* realizado foi com a presença de eserina ou fisostigmina, que é um inibidor específico das colinesterases. Para tal, a eserina foi adicionada no tampão padrão de ensaio na concentração de 1 μM. O soro permaneceu em repouso no tampão com eserina entre um e 30 minutos, porém não foi observada alteração da atividade (Figura 26). O teste com eserina foi realizado para verificarmos se a maior parte da hidrólise do 4-NFA não estava sendo realizada por alguma colinesterase. Para certificar que o tampão com eserina é capaz de inibir colinesterases, foi ensaiada a atividade de BChE em soro humano. A figura 27 demonstra que o uso do tampão com eserina 1 μM no ensaio praticamente inibiu toda a atividade de BChE presente em soro humano.

Figura 26 – Atividade de CaE sobre 4-NFA no soro do dourado, *S. brasiliensis*, com a presença de eserina no meio reacional.



Legenda: Mann Whitney teste t, controle *versus* tratamento, $P > 0,05$.

Figura 27 – Atividade residual de BChE em soro humano e atividade de CaE em soro de dourado, *S. brasiliensis*, com a presença de eserina no meio reacional.



Outro teste realizado foi com o inibidor sintético iso-OMPA ($C_{12}H_{32}N_4O_3P_2$), um inibidor organofosforado específico de butirilcolinesterase. Os resultados são apresentados na figura 28. Parte da atividade foi significativamente inibida apenas quando grandes quantidades de iso-OMPA foram usados (10 e 20 ppm), demonstrando que a maior parte do 4-NFA hidrolisado provavelmente são de isoenzimas de carboxilesterase.

A atividade sérica sobre 4-NFA foi testada na presença de EDTA no meio

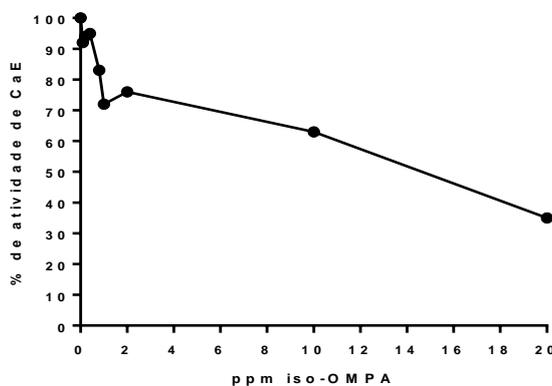
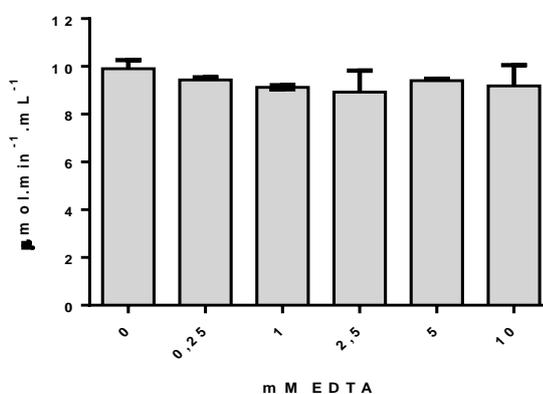


Figura 28 - Atividade residual de CaE em soro de dourado, *S. brasiliensis*, com a presença de iso-OMPA no meio reacional.

reacional como forma de identificar se a atividade medida poderia ser proveniente de uma paraoxonase. Cunha Bastos et al. (2004) demonstraram que o dourado possui considerável atividade de paraoxonase no soro, tendo maior capacidade de hidrólise de paraoxon do que o pacu (*Piaractus mesopotamicus*), o cascudo (*Hypostomus punctatus*) e o matrinxã (*Brycon cephalus*). O EDTA é um quelante, assim, impede a disponibilidade de íons que favorecem a atividade da enzima paraoxonase. Para os testes com soro de dourado foi usado o tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,5 para estabilizar o pH da reação. O soro ficou em repouso por 20 minutos com o EDTA, sendo a atividade medida com a adição de 4-NFA antes da leitura. Conforme demonstrado na figura 29, não foi verificada diminuição da atividade de CaE com a presença do EDTA.

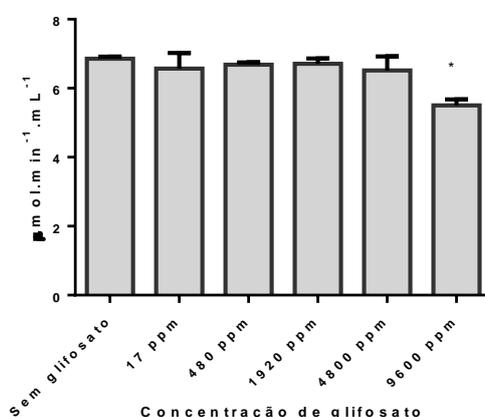
Figura 29 - Atividade de CaE sobre 4-NFA no soro de dourado, *S. brasiliensis*, com a presença de EDTA no meio reacional.



Legenda: Mann Whitney teste t, controle *versus* tratamento, $P > 0,05$.

Ensaio *in vitro* foram realizados com os agrotóxicos usados no experimento de exposição na água. O *pool* de soro de dourado foi deixado em repouso com tampão e com o agrotóxico por 30 minutos em tubo de ensaio. Diferentes concentrações dos princípios ativos foram testadas. Para o herbicida, foi verificada diferença significativa entre as médias de atividade dos ensaios quando 9600 ppm de glifosato foram adicionados ao meio reacional, conforme visualizado na figura 30. A atividade esterásica foi inibida em aproximadamente 20% na maior concentração de glifosato testada.

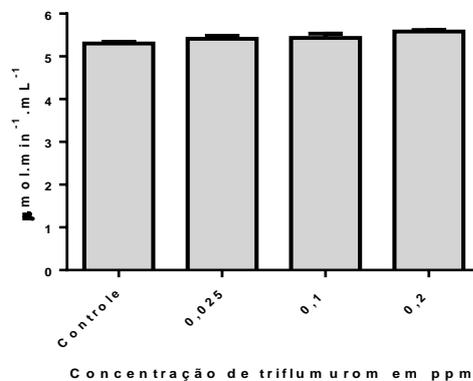
Figura 30 - Atividade de CaE sobre 4-NFA no soro de dourado, *S. brasiliensis*, com a presença de glifosato no meio reacional.



Legenda: *diferença significativa pelo teste de ANOVA seguido por Dunnett ($P < 0,05$).

Com relação aos testes com o inseticida, não foi possível usar altas concentrações de triflumurom, uma vez que esta molécula absorve luz no mesmo comprimento de onda da leitura do ensaio. Não foi possível verificar alteração na atividade de hidrólise do 4-NFA nas condições testadas *in vitro* (Figura 31).

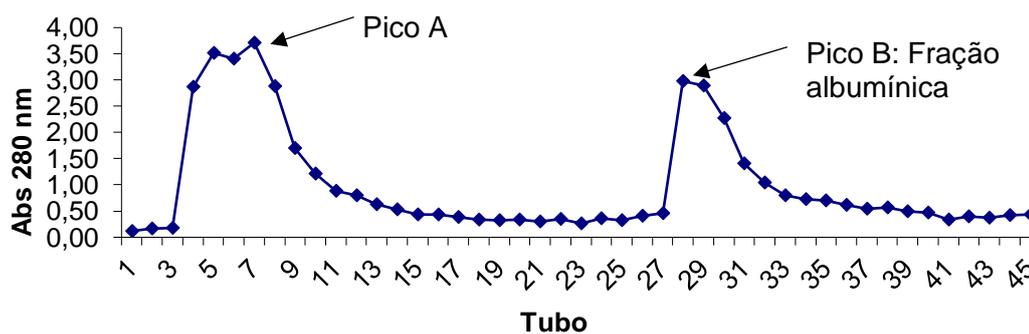
Figura 31 - Atividade de CaE sobre 4-NFA no soro de dourado, *S. brasiliensis*, com a presença de triflumurom no meio reacional (Teste t, $P > 0,05$).



4.6 Semipurificação de carboxilesterase do soro de dourados

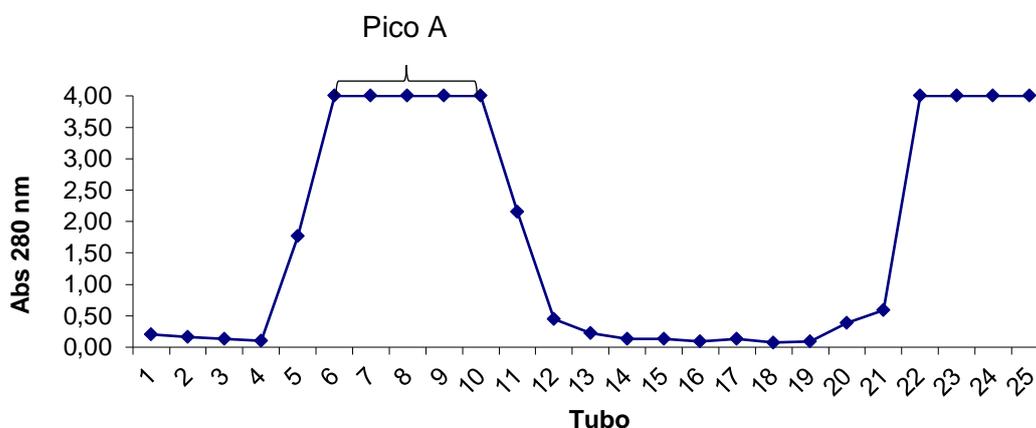
Primeiramente, realizou-se uma cromatografia de afinidade numa coluna HiTrap Blue para retirar a albumina do soro, conforme demonstrado na figura 32.

Figura 32 – Perfil cromatográfico na coluna HiTrap Blue.



As frações enriquecidas com atividade carboxilesterásica (pico A da figura 32) foram aplicadas numa coluna de Sepharose 4B procainamida para reter acetilcolinesterase e butirilcolinesterase (Figura 33).

Figura 33 – Perfil cromatográfico na coluna Sepharose 4B procainamida.



Os tubos enriquecidos em atividade de CaE coletados da coluna Sepharose 4B procainamida (pico A da Figura 33) foram aplicados individualmente numa coluna de exclusão molecular. O perfil cromatográfico na CLAE obtido para os tubos 6, 7, 8, 9 e 10 foram similares. A análise por CLAE apresentou quatro picos de proteína em corridas com duração de 20 minutos. A atividade de CaE sobre 4-NFA foi medida em cada pico, sendo que apenas um dos picos apresentou valores significativos. Foram realizados ensaios de AChE e BChE no pico de interesse, para certificar que a atividade não era colinesterásica. Os resultados são demonstrados na tabela 10.

Tabela 10 - Atividades enzimáticas de esterases em soro de dourado, *Salminus brasiliensis*, após semipurificação.

	Atividade enzimática ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$)		
	AChE	BChE	CaE
Soro dourado após CLAE (semipurificado)	0,004	0,006	0,716
Soro dourado (bruto)	0,136	0,043	3,717
Soro humano	1,857	3,442	1,761

Para verificar a eficiência do protocolo de semipurificação, o rendimento ou recuperação (porcentagem retida de atividade total da enzima originalmente presente) e o fator de purificação (fator pelo qual a atividade específica da preparação aumentou) foram calculados e são demonstrados na tabela 11.

Tabela 11 - Tabela do rendimento da semipurificação de carboxilesterase de soro de dourado, *Salminus brasiliensis*.

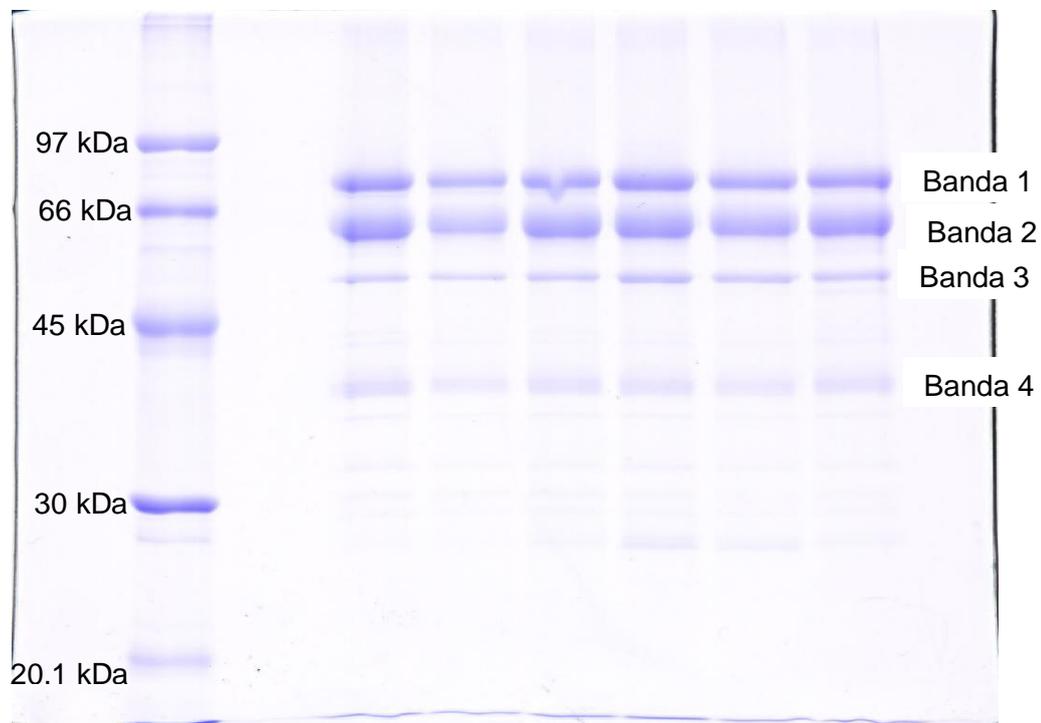
Etapas	Volume (mL)	Proteína total (mg)	Atividade total (U)	Atividade específica (U mg ⁻¹ ptn)	Rendimento (%)	Fator de Purificação (n vezes)
Soro bruto	3	137,28	11,16	0,081	100	1
Coluna HiTrap Blue	1,53	143,5	10,74	0,075	96	0,92
Coluna Sepharose-Procaïnâmica	5	72,7	8,79	0,121	79	1,49
Coluna Shim Pack-Diol 150 (CLAE)	20,7	30,65	6,40	0,209	57	2,57

4.7 Eletroforese

As frações colhidas na etapa da CLAE com os maiores níveis de atividade sobre 4-nitrofenilacetato foram usadas na eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (Figura 34). Todos os picos com atividade coletados na CLAE, provenientes de amostras dos tubos da coluna de Sepharose, apresentaram bandas similares. É possível visualizar quatro bandas, sendo três mais próximas e com peso molecular aproximadamente entre 60 e 50 kDa.

Considerando os resultados de purificação de esterase de soro de piaçu (SALLES, 2004) e pacu (FRAGA, 2010), a terceira banda deve conter a proteína importante com a atividade de esterase que conseguimos ensaiar em soro de dourado. A banda 3, provavelmente, contém nossas isoenzimas de interesse, que consideramos como sendo de carboxilesterases.

Figura 34 - Imagem do gel desnaturante (SDS-PAGE) de fração contendo CaE semipurificada do soro de dourado, *Salminus brasiliensis*.



5. DISCUSSÃO

Enzimas capazes de metabolizar pesticidas no peixe *Salminus brasiliensis*, o dourado, ainda não foram detalhadamente estudadas como biomarcadores. Por isso, procuramos saber se glifosato ou triflumurom, dois pesticidas de uso frequente, afetariam as atividades de etoxicumarina desetilase (ECOD) e etoxirresorufina desetilase (EROD), ambas presentes nos microsossomos do fígado de dourados e dependentes do funcionamento do citocromo P-450 (CYP). Também verificamos se a atividade de carboxilesterase (CaE) presente no soro e em microsossomos de fígado dos dourados poderia sofrer alteração. Além disto, os níveis da atividade da glutathiona S-transferase (GST) em citosol de fígado foram examinados.

Primeiro, foram coletados exemplares no verão e no inverno, com o intuito de estabelecer os níveis basais das atividades enzimáticas ensaiadas. Lamentavelmente, ensaios de atividade nem sempre são feitos em conformidade com a cinética da enzima sob estudo, o que pode levar a conclusões errôneas. Os experimentos para as padronizações das concentrações máximas de substrato e do tempo de ensaio, feitos para que qualquer alteração de atividade medida se atribua unicamente à quantidade de enzima ativa nos ensaios *in vitro* só muito raramente são relatados para enzimas de peixes. Procedimentos em conformidade com uma enzima de outro táxon, realizados usando uma concentração de substrato não adequada para saturar as moléculas da enzima contida na amostra, revelam atividade enzimática, mas não detectam com exatidão o total de moléculas ativas da enzima presente. Para evitar essa falha, em todos os ensaios com amostras obtidas do dourado, todas as medições de velocidade aconteceram com concentração saturante de substrato e dentro de um intervalo de tempo suficiente apenas para consumir até 10% do substrato; o que permitiu comparar a velocidade inicial máxima das reações em ordem zero quanto à concentração de substrato. Assim, em nossos experimentos, qualquer alteração das velocidades, encontrada em microsossomos das células hepáticas, citosol, ou soro, revelou a quantidade de enzima ativa. Isto é deveras importante porque, caso a quantidade de uma enzima ativa no fígado ou no soro mude, acompanhando o grau de contaminação dos dourados, ela poderá ser usada como biomarcadora.

As concentrações ideais de substrato e o tempo de ensaio para medir as atividades da ECOD e da EROD já haviam sido padronizados no laboratório, antes do começo de nossos experimentos, o que permitiu que ensaiássemos tais atividades com precisão. Verificamos que nos microsossomos hepáticos do dourado a atividade da ECOD foi, em média, quinze vezes mais alta que a da EROD (Tabela 4). Por isto, a concentração de proteínas dos microsossomos para ensaiar a atividade da EROD teve de ser 18 vezes maior que a empregada para detectar ECOD. Já que estes dois substratos são empregados para ensaiar a atividade de mono-oxigenase do CYP1A1 (BURKE et al., 1985), podemos afirmar que para medir a atividade do CYP1A1 em microsossomos de fígado de dourados a etoxicumarina deve ser o substrato de escolha, ao invés da etoxirresorufina. Ressaltamos que usando os microsossomos do fígado do peixe *Piaractus mesopotamicus* (pacu) adultos, ocorre o contrário, o ensaio deve ser o da EROD, com o substrato etoxirresorufina (Tabela 6). Tal diferença reforça que para ensaiar atividades de enzimas das diferentes espécies de peixes testes preliminares sejam sempre obrigatórios para caracterização dos substratos adequados.

Candeias (2017) salienta que a variedade de consequências bioquímicas que moléculas de diversas substâncias exercem após serem metabolizadas por CYP torna difícil a identificação dos eventos críticos especificamente responsáveis pela toxicidade. Por isso, alterações nas atividades ECOD e EROD em peixes têm sido consideradas apenas como bons indicadores de exposição, uma vez que nem sempre é fácil estabelecer uma ligação direta entre a indução do CYP e os mecanismos pelos quais ocorrem os efeitos prejudiciais dos xenobióticos nesses animais. Não obstante, desde os anos 1990 sabe-se que atividades de CYP1A1 ensaiadas em amostras de fígado são mais altas em peixes coletados de águas poluídas por hidrocarbonetos bifenílicos policlorados (PCB), dioxinas e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) (GADAGBUI e GOKSØYR, 1996; GOKSOYR e FÖRLIN, 1992; STEGEMAN et al., 1997; WHITLOCK, 1999). O efeito sobre as atividades de CYP 1A1 causado por benzoilfenilureias, grupo químico em que o triflumurom está classificado, ainda não está estudado nos peixes das águas brasileiras. Entretanto, outros estudos, sobre efeitos de benzoilfenilureias similares ao triflumurom, foram relatados. Como o de Drardja-Beldi e Soltani (2003), que relataram ser o Dimilin® (diflubenzurom) na concentração de 0,078 mg/L causador de diminuição nos níveis do tripeptídeo

antioxidante glutationa (GSH) em fêmeas de peixe-mosquito, *Gambusia affinis*, depois de 15 dias de exposição. Zaidi e Soltani (2013) avaliaram fêmeas de *G. affinis* também expostas ao Dimilin e não verificaram efeito sobre o crescimento e o fator de condição (razão entre o peso observado e aquele esperado para um determinado comprimento), bem como na atividade cerebral da acetilcolinesterase, mas observaram aumento na atividade da catalase do hepatopâncreas.

Nossos resultados não mostraram efeito estatisticamente significativo sobre as atividades de ECOD ou de EROD ensaiadas nos microsossomos do fígado de dourados expostos a 0,025 mg de triflumurom/L, nem mesmo a 0,1 mg/L. Mas, 24 h de exposição a 0,1 mg/L, causou uma tendência de aumento da EROD e da ECOD (Figura 20). Já que o diflubenzurom a 25 mg/L provocou no peixe neotropical *Prochilodus lineatus*, o curimbatá, após exposição por 24 e 96 horas, uma indução das atividades enzimáticas de GST e da catalase no fígado (MADUENHO e MARTINEZ, 2008). No entanto, é importante ressaltar que a dose usada no estudo com o curimbatá é alta e dificilmente será encontrada em ambientes aquáticos. Ainda é necessário considerar a estação do ano em que os peixes são analisados, para que alterações naturais não sejam consideradas como causadas por poluição. No caso do estudo com o curimbatá (MADUENHO e MARTINEZ, 2008) os animais eram juvenis, provenientes de cultivo e foram mantidos em tanques com condições controladas, em média a 21 °C; o que caracteriza uma situação mais próxima do inverno comparando aos testes com o dourado (Tabela 3). Ressaltamos que no inverno os dourados tiveram a atividade de ECOD naturalmente maior (Figura 12).

Dalzochio et al. (2016) revisaram artigos publicados entre 2000 e 2015 para compilar informações sobre o uso de biomarcadores para avaliar a saúde dos ecossistemas aquáticos no Brasil. Seus achados relatam que, aproximadamente, 43% dos estudos foram realizados em um único período de amostragem. Portanto, comparações entre os períodos não foram realizadas e, conseqüentemente, os estudos não fornecem dados sobre possíveis variações sazonais nas respostas dos biomarcadores e a contaminação real do cenário. De modo geral, os autores consideraram que, apesar da relação entre as respostas dos biomarcadores e a poluição ter sido observada na maioria dos artigos, desenhos experimentais com múltiplos biomarcadores, maior tamanho das amostras, biomonitoramento a longo prazo e o conhecimento sobre os aspectos ecológicos dos organismos podem permitir

uma melhor interpretação dos dados sobre a qualidade ambiental, bem como a interferência de fatores não poluentes na respostas dos biomarcadores.

Wheelock et al. (2005a) ao testarem a interação de esterases e organofosforados em tecidos de salmão juvenil em condições controladas afirmaram que a mudança no nível de atividade das CaE pode ser usada como biomarcadora de exposição de peixes a substâncias agroquímicas. Li e Fan (1996) mostraram que exemplares de cinco espécies de peixes, *Pseudorasbora parva*, *Carassius auratus*, *Tilapia nilotica*, *Gambusia affinis* e *Salmo gairdneri* pré-tratados com trifenil-fosfato sofreram inibição da carboxilesterase; esta inibição aumentou a toxicidade do malation, princípio ativo de um inseticida organofosforado. Fraga (2010), estudando a atividade de esterases de curimatá, pacu e piavuçu, verificou que a atividade da CaE do soro foi pelo menos 100 vezes mais sensível ao metilparaoxon do que as atividades de AChE e BChE. Comprovou também que o clorpirifós-oxon (organofosfato derivado do clorpirifós) inibiu marcadamente as esterases do sangue das três espécies testadas. Apesar dos agrotóxicos organofosforados como o Folidol® e similares terem sua comercialização proibida no Brasil, ainda é possível o seu uso clandestino. Além do uso nas lavouras, segundo Boeger (1999), piscicultores utilizavam compostos organofosforados e outros produtos químicos não destinados para uso na piscicultura no tratamento da lerneia, o que pode ter consequências graves para o processo produtivo, o meio ambiente e a saúde dos seres humanos que forem consumir o peixe ou manipular tais produtos durante os tratamentos dos tanques.

Uma vantagem significativa dos biomarcadores baseados na atividade da carboxilesterase do soro é que os ensaios não implicam em morte, ao contrário do uso da atividade da acetilcolinesterase do cérebro, que só pode ser ensaiada depois da eutanásia para retirada do encéfalo. O ensaio da CaE a partir do sangue dos peixes é um método viável, menos invasivo e que preserva a vida do animal. Segundo Thompson et al. (1991), a atividade da carboxilesterase plasmática é geralmente baixa em mamíferos, mas é maior nos peixes, nos anfíbios e nas aves. A maior dispersão da atividade de CaE no soro dos dourados selvagens quando comparada aos dourados de cultivo (Figura 15) era esperada, uma vez que os peixes de cultivo sempre estiveram expostos a condições ambientais semelhantes desde o nascimento e continuaram habitando o mesmo espaço e recebendo o mesmo tipo de alimentação

em determinados horários do dia. Os peixes selvagens são heterogêneos, com idade, tamanho e alimentação distintos.

Ensaando a CaE do soro de dourados de cultivo os valores de $V_{m\acute{a}x}$ ficaram entre $5,73 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$, segundo o modelo cinético de Michaelis e Menten e $6,48 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$, segundo o modelo cinético de Radić (RADIĆ et al., 1993) (Figura 13). Os valores da K_M , para os respectivos modelos cinéticos, foram $0,41 \text{ mM}$ e $0,54 \text{ mM}$. Padronizar os ensaios da atividade de carboxilesterase dos dourados foi também necessário para comparar o valor da constante da catálise em primeira ordem, ou k , da atividade presente no soro de dourado com aquelas do soro de outras espécies, pois o valor de k vem da divisão do valor da $V_{m\acute{a}x}$ pelo valor da K_M . A atividade de hidrólise do 4-nitrofenilacetato por soro de dourado tem um valor de k , ou eficiência catalítica, de $13,9 \text{ min}^{-1}$, cerca de metade do que o calculado para soro de curimatá, mas dez vezes maior que o do piavuçu e 1,4 vezes o do pacu (Tabela 7). Concluimos, por isto, que o dourado, comparado a outras espécies neotropicais, tem importante eficiência em seu soro para hidrolisar ésteres substratos da CaE. Além disso, a CaE no soro do dourado mostra-se importante por apresentar uma atividade, pelo menos, 50 vezes maior em relação às atividades de AChE e BChE no soro (Tabela 10). Assim, a considerável atividade catalítica de CaE detectada no soro dos dourados indica que no soro da espécie existem moléculas de CaE que podem captar estequiometricamente ou hidrolisar alguns xenobióticos, evitando, assim, que inibam colinesterases indispensáveis para a vida do animal caso atinjam órgãos vitais como o coração e o cérebro.

Salles et al. (2006) demonstraram que a atividade de acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE) em soro de diversas espécies de peixes varia consideravelmente. Nossos resultados, que mostraram diferenças entre as atividades de CaE séricas do dourado, do curimatá, do pacu e do piavuçu, indicam que cada espécie deve ter um fenótipo para a atividade de CaE do soro, à semelhança do relatado por Salles et al. (2006). Maxwell (1992), após estudos com ratos envolvendo atividade de CaE e reações com compostos organofosforados, demonstrou que a CaE desempenha um papel muito importante quanto aos processos de desintoxicação. A alta afinidade da CaE por um éster do ácido fosfórico é importante para a capacidade de desintoxicação dos organofosforados muito tóxicos. Isto acontece porque, de fato, mesmo que não ocorra rápida e repetida hidrólise de milhares de moléculas do éster,

o sítio ativo de uma esterase pode ficar bloqueado para um novo ciclo de hidrólise pelo grupo fosfato do éster ligado a ela, permitindo que tal ligação do éster com uma grande quantidade de moléculas de esterases diminua estequiometricamente o número de moléculas do organofosforado livres, que são aquelas capazes de inibir colinesterases caso atinjam o coração e o cérebro. Dentre as espécies verificadas até aqui, o curimatá, provavelmente, é mais resistente aos efeitos tóxicos de organofosforados devido à maior atividade de CaE presente em seu soro. No entanto, o piavuçu tem a atividade de BChE do seu soro bastante elevada, o que também lhe confere capacidade de hidrolisar organofosforados (SALLES et al., 2006) de modo a desintoxicar-se com eficiência. Solé et al. (2012), ao caracterizarem esterases de diferentes tecidos de linguados juvenis e adultos de cultivo da espécie *Solea senegalensis*, verificaram que no plasma de juvenis a acetilcolinesterase possui maior atividade. Porém, nos indivíduos adultos a maior atividade esterásica é de uma CaE, mas a atividade no plasma foi a menor quando comparada com a dos demais tecidos estudados. Estes autores concluíram que a atividade plasmática de *S. senegalensis* adultos não é um parâmetro apropriado para ser incluído em monitoramentos. Para o caso do dourado, a atividade do soro ou plasma é um indicador válido, uma vez que teve uma faixa definida de atividade e com valores relativamente altos. De qualquer forma, todas as pesquisas, incluindo a nossa, demonstram a necessidade de estabelecer o nível basal da atividade de cada esterase por espécie, idade e tecido, para assim decidir como ensaiar a atividade biomarcadora mais eficaz; que melhor atenderá ao monitoramento desejado.

A atividade de CaE que ensaiamos no soro dos dourados diminuiu no inverno, ao contrário da atividade medida na fração dos microsossomos do fígado, que foi mais alta no inverno e menor no verão (Figura 17). Verificamos que a atividade de ECOD também variou sazonalmente no fígado. Estas variações podem estar relacionada com as reservas metabólicas do peixe, de acordo com seus hábitos de alimentação e reprodução. O inverno é um período em que os dourados estão menos ativos, enquanto no verão realizam migrações reprodutivas. Estudos com ratos demonstraram que carboxilesterases são secretadas pelo retículo endoplasmático do fígado para o plasma (SATOH e HOSOKAWA, 2006) e que elas hidrolisam éster de colesterol, que é precursor de hormônios sexuais (BECKER et al., 1994). Assim, a observação da atividade de CaE mais elevada no soro e reduzida no fígado dos

dourados durante o verão pode ter relação com o aumento na circulação de hormônios sexuais durante o período de reprodução; o fígado secreta para o sangue maiores quantidades de isoenzimas de CaE que poderiam atuar no metabolismo do colesterol. Além disso, no inverno, pode haver maior quantidade de aminoácidos e proteínas livres circulando no sangue para usar na obtenção de energia. Com isto inferimos que durante o inverno o dourado possa estar mais propenso a efeitos de xenobióticos que sofrem biotransformação catalisada por CaE do que no verão.

A detecção de mudança de nível de atividade de CaE nos microsomas de fígado dos dourados não se mostrou útil para biomarcar o contato dos peixes com o glifosato ou com o triflumurom (Figura 22), pois não observamos alteração significativa. Por outro lado, ensaiar a CaE no soro indicou que os níveis da atividade no inverno (Figura 23) aumentou nos peixes expostos a triflumurom e glifosato em comparação a experimentos feitos no verão (Figura 24). Ainda será preciso testar outras concentrações e tempos de exposição, bem como outros tipos de xenobióticos para considerarmos a atividade de CaE do soro de dourado um biomarcador de uso geral, entretanto, o aumento claro de sua atividade no soro dos dourados expostos no inverno indica que, de fato, que colher o soro de dourados para ensaiar CaE tem mesmo a vantagem de poupar a vida dos animais. Há que se cuidar para colher e processar o sangue em tempos mais curtos que os que permitam alteração por estresse de manuseio, já que em um estudo realizado com dourados juvenis mantidos em cativeiro foi visto que a periódica manipulação aumentou a atividade hepática das enzimas antioxidantes glutathione redutase e glutathione S-transferase, sendo que após alguns dias de experimento houve redução destas duas atividades, mas ativação simultânea da glutathione peroxidase. Tais dados indicam que o estresse do manejo pode causar modificações fisiológicas subletais nos dourados (BRAUN et al., 2010).

Não há ainda caracterização molecular definitiva da proteína responsável pela atividade carboxilesterásica presente em plasma de dourados. Buscando denominar apropriadamente tal atividade no plasma do dourado, fizemos testes com inibidores típicos das esterases de outros animais. O teste com concentrações crescentes de EDTA no meio reacional não mudou a atividade (Figura 29), assim como mostrado por Li et al. (2005), que estudaram esterases de plasma humano e confirmaram que a carboxilesterase não é inibida por EDTA. No entanto, Cunha Bastos (2001) verificou que 43% da atividade sérica do pacu foi inibida quando 10 mM de EDTA estavam

presentes. A mesma autora demonstrou que a atividade de paraoxonase em soro de dourado correspondente a 24% da atividade do soro de camundongo (CUNHA BASTOS et al., 2004). Como o EDTA inibe a atividade da paraoxonase porque captura íons Ca^{++} indispensáveis para esta enzima, o teste com EDTA também excluiu a hipótese da atividade sobre 4-NFA do soro de dourados provir de paraoxonase.

O fato do ensaio de CaE não ter sido inibido por 1 μM de eserina (Figuras 26 e 27), que inibiu, comprovadamente, a atividade sobre 4-NFA do soro humano atribuída a BChE (Figura 27), afasta, ainda, a possibilidade de a atividade ser proveniente de uma butirilcolinesterase, ou mesmo de uma acetilcolinesterase. Nesta linha de raciocínio, testamos o ensaio *in vitro* com iso-OMPA, inibidor específico de BChE, e vimos que ocorreu inibição de forma significativa em concentrações acima de 2 ppm de iso-OMPA no meio reacional (figura 28). Estes resultados dos testes com inibidores *in vitro* de esterases do soro de dourado foram similares aos relatos por Fraga (2010) para outras espécies de peixes nativos. Segundo a autora, assim como verificamos para o dourado, as atividades sobre 4-NFA de soros de curimatá, de pacu e de piavuçu foram pouco sensíveis a eserina e ao iso-OMPA no tempo de incubação testado (30 min) e na maior concentração utilizada (1×10^{-3} M). Por tais achados, os testes que fizemos *in vitro* dão suporte para que a atividade de hidrólise do 4-NFA em soro de dourado possa ser denominada de carboxilesterase.

Em nosso laboratório, fazendo a padronização dos ensaios de GST com os substratos CDNB e GSH (Figura 18) medimos uma atividade inicial máxima em citosol do fígado de dourados próxima à encontrada em tainhas selvagens adultas que foi de $2,8 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteínas (BASTOS et al., 2013). Esse valor, como visto na tabela 9, é mais do que o triplo encontrado no citosol do fígado de matrinxãs (*Brycon cephalus*) e cascudos (*Hypostomus punctatus*) adultos (RODRIGUES, 2003); e mais do que o dobro encontrado para o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (ROCHA-SANTOS et al., 2018). Em termos de eficiência ($V_{\text{máx}}/K_M$), a calculada para o citosol do fígado do dourado foi aproximadamente a metade da calculada para pacu e mais de dez vezes as das GST do citosol dos fígados de cascudos e matrinxãs. Estes níveis de atividade são compatíveis com uma significativa função desintoxicadora da atividade de GST no fígado de dourados por conjugação de xenobióticos eletrofílicos com glutathiona (GSH). Não usamos dez vezes o valor da K_M , como consagrado pela equação de Michaelis-Menten para garantir a velocidade máxima inicial dos ensaios,

porque o CDNB não é solúvel em altas concentrações e também porque precisávamos economizar GSH.

A atividade de GST em vários organismos pode estar aumentada como resultado de aumento da biossíntese de novas moléculas de GST após absorção de xenobióticos. Por exemplo, Martinez-Lara et al. (1996) mostraram através de ensaio enzimático com substratos específicos que algumas isoenzimas do peixe *Sparus aurata* foram induzidas especificamente por determinados xenobióticos, tais como dieldrin, cloreto de cobre e aroclor. Também foi observado aumento significativo da atividade de GST em trutas tratadas com o fungicida propiconazol (EGAAS et al., 1999). Outros ensaios da atividade de GST já foram descritos como capazes de indicar se um peixe absorveu xenobióticos (BASTOS et al., 2013; PEREZ-LOPEZ et al., 2002). Modesto e Martinez (2010), em testes similares com curimatás expostos a 10 mg L^{-1} de Roundup® registraram, após 24 horas, aumento da atividade de GST hepática em relação ao grupo controle. Os autores dizem que a alteração provavelmente foi por causa do aumento no processo de biotransformação de xenobióticos no animal exposto. Com as doses e os tempos que testamos, a atividade de GST do citosol de fígado de dourados frente a exposições dos dourados ao glifosato e ao triflumurom só se mostrou diminuída quatro horas depois da mistura na água de triflumurom a 0,1 ppm (Figura 21). Dado que este efeito deve ser considerado agudo porque se deu dentro de 4 horas, o próximo passo é estabelecer que essa diminuição possa corresponder a uma liberação de GST para o plasma, como já foi aventado no caso de danos ao fígado humano (MAINA et al., 2016). Caso ensaios de GST possam ser biomarcadores em dourados de lesões agudas do fígado, podem vir a provar-se úteis para medidas que visem biomonitoramento em campo; situação em que os efeitos por exposição prolongada de um peixe a um poluente tornam-se menos prováveis.

Com relação ao glifosato não foi verificada nenhuma alteração estatisticamente significativa nas atividades enzimáticas no fígado dos dourados. É importante ressaltar que a concentração de glifosato usada de $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ está próxima das maiores já registradas na literatura. Guilherme et al. (2010) apresentam que em água naturais o glifosato e seus equivalentes ácidos foram detectados em concentrações de 0,01 a 0,7 mg por litro, atingindo $1,7 \text{ mg L}^{-1}$ em situação extrema. A constatada diminuição da atividade da CaE presente em soro pelo glifosato no teste *in vitro*, só

foi possível com glifosato em concentração que está acima dos relatos das concentrações encontradas em águas superficiais e acima do limite estabelecido na legislação. Assim, pode-se dizer que o dourado não apresenta alterações significativas de atividade de carboxilesterase em soro por contato direto enzima-xenobiótico quando são baixas as concentrações de glifosato circulante. Podemos então inferir que o aumento no inverno da atividade de CaE do soro de dourados (Figura 23) resulta de uma possível mudança na quantidade secretada da enzima a partir do fígado.

Williams et al. (2000), em um artigo de revisão, se propuseram a produzir uma avaliação quanto a segurança e ao risco para seres humanos do Roundup®. Os autores concluíram que o uso o Roundup®, em acordo com seu correto manuseio para uso agrícola, não apresenta risco à saúde humana. Langiano e Martinez (2008) estudando efeitos da exposição do curimatá, *Prochilodus lineatus*, a concentrações de 7,5 e 10 mg L⁻¹ de Roundup®, identificaram aumento dos níveis de glicose no plasma, indução de uma variedade de alterações histológicas do fígado e aumento na atividade da catalase hepática, mas a atividade da GST hepática não teve alteração. Nós não verificamos alteração na atividade de GST nos dourados no inverno, porém a dose usada de glifosato foi inferior aos testes já publicados com o curimatá. No entanto, estudos com diferentes organismos revelam condições nocivas do glifosato. Resultados de pesquisas envolvendo anfíbios e Roundup® sugerem que este composto pode causar taxas extremamente altas de mortalidade para anfíbios, podendo levá-los a declínios populacionais (RELYEA, 2009).

Outros estudos também não verificaram variações enzimáticas após exposição ao glifosato. Kwiatkowska et al. (2014) verificaram o efeito do glifosato na atividade da AChE em eritrócitos humanos postos *in vitro* com concentrações que variaram de 0,01 a 5 mM durante 1 e 4 horas. Os autores verificaram diminuição significativa na atividade da AChE, próximo de 20%, nas concentrações elevadas dos compostos, encontradas apenas em envenenamentos agudos. Assim, concluíram que se o glifosato for usado nas concentrações que são usualmente encontradas no ambiente não perturbará a função da acetilcolinesterase em eritrócitos humanos.

Thongprakaisang et al. (2013) apontam que o glifosato pode induzir o crescimento de células mamárias cancerígenas em humanos, via receptores de estrogênio. Van Bruggen et al. (2018) compilaram dados sobre diversos estudos

envolvendo glifosato e seus produtos de decomposição. Verificaram que os efeitos agudos em mamíferos são baixos, mas há dados que apontam possíveis efeitos sobre a saúde associados a doses crônicas relacionadas ao acúmulo desses compostos e que a pressão de seleção pela resistência ao glifosato em bactérias pode levar ao aumento da resistência a antibióticos. Os autores recomendam que pesquisas interdisciplinares sobre as associações entre exposição crônica de baixo nível a herbicidas, distorções em comunidades microbianas, expansão da resistência a antibióticos e o surgimento de doenças em humanos, animais e plantas devido a exposição ao glifosato, sejam realizadas.

Machado (2016) aponta que a controvérsia em torno do glifosato é de relevante discussão, porque permeia o modelo agrícola dominante, que colocou o Brasil nas primeiras posições quanto ao consumo de agrotóxicos no mundo. Outro ponto destacado pela autora são as questões de saúde, que possuem perspectivas complicadas do ponto de vista político; se por um lado o Estado não reage ou é negligente está correndo o risco de ser responsável por um grande escândalo, por outro lado, se proíbe e depois fica demonstrado que não havia riscos, será acusado de ter tomado uma decisão eleitoreira ou ideológica. Evidencia-se assim que a ciência está entrelaçada aos interesses políticos e econômicos, apesar de sua pretensa neutralidade (MACHADO, 2016).

De acordo com a tabela de purificação (Tabela 11), no final do processo obteve-se uma fração de soro 2,5 vezes purificada com rendimento de 56%. Foi possível obter uma fração com apenas quatro bandas aparentes no gel de eletroforese SDS-PAGE. A identificação e classificação das CaE é ambígua, devido à sobreposição de especificidade de substrato. Uma única hidrolase exibe propriedades de CaE, lipase ou ambas, atuando em substratos ésteres e lipídicos. As classificações das CaE conhecidas, principalmente de mamíferos, consideram também a sequência de aminoácidos e sua homologia com outras CaE já descritas (SATOH e HOSOKAWA, 2006; REDINBO e POTTER, 2005). Infelizmente, ao usarmos espectrometria de massas para identificar sequências de aminoácidos dos fragmentos polipeptídicos das bandas 1; 2; 3 e 4 da eletroforese desnaturante que fizemos da fração semipurificada da CaE do soro de dourados (Figura 34), não foi possível identificar nenhuma sequência dos fragmentos como pertencentes a uma carboxilesterase. É bem verdade que o banco de dados do *software* empregado pode não identificar sequências de

proteínas nunca antes sequenciadas. Assim, a denominação que empregamos aqui de carboxilesterase (CaE) para a atividade que ensaiamos está mais afinada com a função catalítica, de maior relevância bioquímica, do que com uma sequência de aminoácidos já reconhecida, por exemplo, para outras proteínas carboxilesterases de ratos e humanos.

As carboxilesterases podem ser medidas em diferentes tecidos e com diversos substratos, tendo características desejáveis para um biomarcador, pois são de rápida análise, baixo custo e podem ser medidas em soro ou plasma. Wheelock et al. (2005b) relatam que a atividade geral de CaE de ensaios colorimétricos são convenientes devido ao seu baixo custo, fácil disponibilidade e ensaio ótico relativamente barato para aquisição de dados. No entanto, os autores apontam que é provável que algumas isoenzimas CaE não hidrolisem todos os substratos de forma eficiente. Diferentes substratos são usados nos ensaios de CaE, sendo consenso que há variação entre os resultados obtidos dependendo de qual substrato for usado, para qual espécie e qual tecido. Wheelock et al. (2008) ressaltam a importância da seleção de substratos para garantir uma medição precisa do ponto final desejado para carboxilesterases, recomendando o uso dos substratos 4-NFA e α -naftil acetato. Os ensaios com dourado foram feitos com 4-NFA e atingiram níveis facilmente detectáveis. Solé et al. (2012) concluíram que para o *S. senegalensis* o método ultravioleta com o α -naftil acetato é o mais apropriado para ensaiar CaE. Vincze et al. (2015), ensaiando a atividade de CaE em cérebro de trutas com p-NFA e 4-nitrophenil valerato (NPV), verificaram resultados diferentes; enquanto o ensaio com p-NFA não revelou diferenças entre os grupos de exposição e controle, usando o NPV foi detectada uma diminuição da atividade enzimática em peixes expostos a poluição. Assim, é conveniente testar outros substratos hidrolisáveis pela CaE em futuras análises com o dourado.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

É de grande importância a obtenção de informações a respeito da bioquímica de animais aquáticos, principalmente daquelas espécies que vivem em águas sujeitas aos impactos antrópicos. Alguns mecanismos de desintoxicação do dourado *S. brasiliensis* foram caracterizados, estabelecendo condições para análise e níveis basais de atividades enzimáticas para esta espécie, com destaque para o protocolo com uso de sangue, por ser um método sem a necessidade de eutanásia.

Para uma apurada precisão dos biomarcadores enzimáticos de amostras de peixes é importante que haja a padronização do ensaio, visando atingir as condições ótimas que possibilitam as comparações de eficiência da enzima e a sua afinidade pelo substrato (K_M). A maior parte dos ensaios estabelecidos são voltados, majoritariamente, para estudos com ratos e humanos. Nas atividades de mono-oxigenases (CYP 1A1) medidas nos microsomas do fígado de dourado o melhor substrato foi a etoxicumarina, uma vez que o ensaio de ECOD apresentou valores muito maiores do que o da EROD. Verificamos também que existe mudança sazonal na atividade da ECOD, no inverno a atividade enzimática foi maior do que no verão.

Os substratos CDNB a 2,5 mM e o GSH a 2,0 mM usados para mensurar a atividade geral de GST hepática permitiram detecção clara da atividade e não verificamos alteração sazonal. Por comparação com outras espécies de peixes neotropicais o nível da atividade de GST para conjugar CDNB e GSH em citosol de fígado de dourados é expressivo e importante para desintoxicação desta espécie.

Com relação ao ensaio de CaE estabelecemos que 5 mM do substrato 4-NFA no meio reacional é o indicado para garantir alta detecção da atividade enzimática do soro e da fração dos microsomas do fígado dos dourados. A atividade de CaE no fígado foi maior no inverno do que no verão. Os níveis de atividade da CaE do soro subiram significativamente em dourados expostos no inverno a 0,025 e 0,1 ppm de trifluorometil e também em dourados expostos a 1,5 ppm de glifosato. Assim, a atividade de CaE do soro de dourados pode ser usada como biomarcador de exposição dos dourados ao glifosato e ao trifluorometil no inverno. No entanto, as atividades enzimáticas ensaiadas no fígado (mono-oxigenase, GST e CaE) não se

mostraram biomarcadores eficientes para a exposição do dourado a 0,025 e 0,1 ppm de triflumurom ou 1,5 ppm de glifosato nos tempos testados.

O dourado parece ser capaz de se desintoxicar eficientemente de concentrações ambientalmente relevantes de inseticidas com triflumurom e de herbicidas com glifosato, que são os mais usados mundialmente. Contudo, testes por longo tempo de exposição com as mesmas quantidades são necessários para avaliar possíveis efeitos crônicos.

Este estudo com o peixe dourado (*Salminus brasiliensis*), assim como outros que envolvam a interação de agrotóxicos com organismos não alvo, são importantes para auxiliar nas tomadas de decisões sobre a regulamentação do uso de produtos defensivos agrícolas. No Brasil, atualmente, está tramitando no Congresso o projeto de lei 6299/2002, para alterar a aprovação, registro e a comercialização de agrotóxicos. Entre as mudanças, está uma que facilitará e acelerará a liberação do uso de agrotóxico antes de estudos específicos, baseando-se na afirmação de que outros com o mesmo princípio ativo já foram aprovados. Para ambientalistas, promotores federais, movimentos sociais e de defesa do consumidor, a proposta é inadequada. Por outro lado, os relatores do projeto alegam que as mudanças visam acelerar os trâmites para aprovação do uso antes que os produtos cheguem obsoletos ao mercado.

Esperamos que as informações geradas com o desenvolvimento desta pesquisa sejam úteis para o monitoramento da poluição dos ambientes aquáticos e que possam servir para regulamentações do uso de agrotóxicos, assim como para a preservação do dourado em ambiente natural e para a melhoria do seu cultivo.

Certamente que o uso de biomarcadores enzimáticos deve ser mais difundido, pois eles auxiliam a conciliar a necessidade de crescimento da humanidade e a preservar o meio ambiente.

REFERÊNCIAS

ALVES FILHO, J. P. *Uso de agrotóxicos no Brasil: controle social e interesses corporativos*. São Paulo: Annablume e Fapesp, 2002.

AMARANTE JÚNIOR, O.P. et al. 2002. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. *Química Nova*, v. 25, n 4, p. 589-593, 2002.

AMIR, O. G. e PEVELING, R. Effect of triflumuron on brood development and colony survival of free-flying honeybee, *Apis mellifera* L. *Journal of Applied Entomology*, v. 128, p. 242-249, 2004.

ANVISA. 2015. *Registros e Autorizações de Agrotóxicos*. Disponível em <<http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos>>. Acesso em 12 ago 2015.

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.

BADAWAY, M. E. I. et al. Toxicity assessment of buprofezin, lufenuron and triflumuron to the earthworm *Aporrectodea caliginosa*. *International Journal of Zoology*, v. 2013, Article ID 174523, 9 p., 2013.

BASTOS, F. F. et al. Enzymatic GST levels and overall health of mullets from contaminated Brazilian Lagoons. *Aquatic Toxicology*, v. 126, p. 414– 423, 2013.

BECKER, A. et al. Purification, cloning, and expression of a human enzyme with acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase activity, which is identical to liver carboxylesterase. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 14, p. 1346-1355, 1994.

BIANCHINI, A. Praguicidas. In: *Poluição Marinha*. BAPTISTA NETO, J. A.; WALLNER-KERSANACH, M. e PATCHINEELAM, S. M. (Org.). Rio de Janeiro: Interciência, p 161-176, 2008.

BOEGER, W. A. Lernea: Biologia e Prevenção. *Revista Panorama da Aquicultura*, v. 56, nov/dez, 1999.

BOMBARDI, L. M. *Geografia do Uso de Agrotóxicos no Brasil e Conexões com a União Europeia*. São Paulo: FFLCH – USP, 2017.

BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*.

BRASIL. Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. *Diário Oficial da União*.

BRAUN, N. et al. Growth, biochemical and physiological responses of *Salminus brasiliensis* with different stocking densities and handling. *Aquaculture*, v. 301, n. 1-4, p. 22-30, 2010.

BURKE, M.D. et al. Ethoxy-, penthoxy- and benzyloxyphenoxazones and homologues: a series of substrates to distinguish between different induced cytochromes P450. *Biochemical Pharmacology*, v. 34, p. 3337-3345, 1985.

CAMACHO, L. et al. Effects of β -naphthoflavone on the levels of glutathione S-transferase from liver of pacu, *Piaractus mesopotamicus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 64, p. 191-196, 2000.

CANDEIAS, M.S.G. 2017. *Sistemas de biotransformação e de resposta ao stress de *Petromyzon marinus* L.* 240 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Instituto de Investigação e Formação Avançada, Universidade de Évora, Évora, Portugal, 2017.

CARSON, R. *Primavera silenciosa*. São Paulo: Gaia, 2010.

CAPRA, F. I. Crise e transformação. In: *O ponto de mutação*. 22 ed. São Paulo: Cultrix, p. 17-46, 1999.

CARNEIRO, P.C.F. Tecnologias de produção e armazenamento de sêmen de peixes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 31, n. 3, p. 361-366, 2007.

CHAMBERS, J.E. e YARBROUGH, J.D. Xenobiotic biotransformation systems in fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 55C, p. 77-84, 1976.

CHANDA, S. M. et al. Tissue-specific effects of chlorpyrifos on carboxylesterase and cholinesterase activity in adult rats: an *in vitro* and *in vivo* comparison. *Fundamental and Applied Toxicology*, v. 38, p. 148-157, 1997.

CUNHA BASTOS, V.L.F. 2001. *Enzimas do metabolismo de xenobióticos em *Piaractus mesopotamicus* (pacu)*. 164 f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.

CUNHA BASTOS, V.L.F. et al. Paraoxonase activity in sera of four neotropical fish. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 72, p. 798-805, 2004.

CURCI, O. H. *Toxicología*. Buenos Aires: Ediciones Médicas del Sur, 2009.

DALZOCHIO, T., G.Z.P. et al. The use of biomarkers to assess the health of aquatic ecosystems in Brazil: a review. *International Aquatic Research*, v. 8, n. 4, p. 283–298, 2016.

DRARDJA-BELDI, H. e SOLTANI, N. Laboratory evaluation of dimilin on growth and glutathion activity in mosquitofish, a non-target species. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, v. 68 (4a), p. 299-305, 2003.

EFSA, European Food Safety Authority. *Conclusion on the peer review of triflumuron*. Itália: EFSA, 194, p. 1-93, 2008. Relatório Científico.

EGAAS, E. et al. Some effects of the fungicide propiconazole on cytochrome P450 and glutathione S-transferase in brown trout (*Salmo trutta*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. 122C, p. 337-344, 1999.

ELLMAN, G.L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, v. 7, p. 88-95, 1961.

FRAGA, A. S. 2010. *Acetilcolinesterase, butirilcolinesterase, carboxilesterase e a resistência de peixes neotropicais aos pesticidas organofosforados*. 55 f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

GADAGBUI, B.K-M. e GOKSØYR, A. CYP1A and other biomarker responses to effluents from a textile mill in the Volta River (Ghana) using caged tilapia (*Oreochromis niloticus*) and sediment-exposed mudfish (*Clarias anguillaris*). *Biomarkers*, v. 1, p. 252-261, 1996.

GHAZALA, S. M. et al. Fish cholinesterases as biomarkers of sublethal effects of organophosphorus and carbamates in tissues of *Labeo rohita*. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, v. 28, n. 3, p. 137-142, 2014.

GHOLAMI-SEYEDKOLAEI et al. Effect of a glyphosate-based herbicide in *Cyprinus carpio*: Assessment of acetylcholinesterase activity, hematological responses and serum biochemical parameters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 98, p.135–141, 2013.

GIL, F. e PLA, A. Biomarkers as biological indicators of xenobiotic exposure. *Journal of Applied Toxicology*, v. 21, p. 245–255, 2001.

GOKSOYR, A. e FÖRLIN, L. The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquatic Toxicology*, v. 22, p. 287-312, 1992.

GUILHERME, S. et al. European eel (*Anguilla anguilla*) genotoxic and pro-oxidant responses following short-term exposure to Roundup®—a glyphosate-based herbicide. *Mutagenesis*, v. 25, n. 5, p. 523–530, 2010.

HABIG, W. H.; PABST, M. J. e JAKOBY, W.B. Glutathione S-Transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, v. 249, p.7130-7139, 1974.

HAYES J. D. Purification and characterization of a polymorphic Yb containing glutathione S-transferase, GST from human liver. *Clinical Chemistry and Enzymology Communications*, v.1, p. 245-264, 1989.

HAYES, W. A. *Principles and Methods of Toxicology*. 3 ed. New York: Raven Press Inc, 1994.

HELFRICH, L. A. et al. *Pesticides and Aquatic Animals: A Guide to Reducing Impacts on Aquatic Systems*. Disponível em <<http://www.ext.vt.edu/pubs/waterquality/420-013/420-013.html>>. Acesso em 08 jul 2014.

HERRMANN K. e WEAVER, L. The Shikimate Pathway. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v. 50, p. 473-503, 1999.

IBAMA. 2015. *Avaliação Ambiental de Agrotóxicos e Afins*. Disponível em <<http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos>>. Acesso em 12 ago 2015.

IBGE. 2015. *Indicadores de desenvolvimento sustentável: Brasil 2015*. Disponível em <<http://biblioteca.ibge.gov.br/biblioteca-catalogo?view=detalhes&id=294254>>. Acesso em 12 ago 2015.

JABLONSKI, C. A. et al. Genotoxicidade e citotoxicidade em peixes submetidos ao triflumuron utilizado nas culturas no Rio Grande do Sul. In: ANAIS DA JIC – JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA. Universidade Federal da Fronteira Sul, v. 1, n. 7, 2017. Disponível em: <<https://periodicos.uffs.edu.br/index.php/JORNADA/article/view/5640>>. Acesso em: 02 jun. 2018.

KLEMMZ, C. et al. Cytochrome P450 detection in liver of the catfish *Ancistrus multispinis* (Osteichthyes, Loricariidae). *Brazilian Archives of Biology and Technology* [online], v. 53, n. 2, p. 361-368, 2010.

KÜSTER, E. Cholin- and carboxylesterase activities in developing zebrafish embryos (*Danio rerio*) and their potential use for insecticide hazard assessment. *Aquatic Toxicology*, v. 75, p. 76–85, 2005.

KWIATKOWSKAA, M. et al. The effect of glyphosate, its metabolites and impurities on erythrocyte acetylcholinesterase activity. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 37, n. 3, p. 1101-1108, 2014.

LANGIANO, V.C. e MARTINEZ, C.B.R. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 147 (parte C), p. 222–231, 2008.

LI, B. et al. Butyrylcholinesterase, paraoxonase, and albumin esterase, but not carboxylesterase, are present in human plasma. *Biochemical Pharmacology*, v. 70, p. 1673–1684, 2005.

LI, S.N. e FAN, D.F. Correlation between biochemical parameters and susceptibility of freshwater fish to malathion. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, v. 48, n. 4, p. 413–418, 1996.

LIMA, F.C.T. e BRITSKI, H.A. *Salminus franciscanus*, a new species from the rio São Francisco basin, Brazil (Ostariophysi: Characiformes: Characidae). *Neotropical Ichthyology*, v. 5, n. 3, p.237-244, 2007.

LUSHCHAK, O.V. et al. Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. *Chemosphere*, v. 76, p. 932–937, 2009.

MACHADO, C. J. S. *Desenvolvimento sustentável para o Antropoceno: um olhar panorâmico*. Rio de Janeiro: E-papers, 2014.

MACHADO, M. O. *Glifosato: À emergência de uma controvérsia científica global*. 2016. 315 f. Tese (Doutorado em Ciências Humanas) - Doutorado Interdisciplinar em Ciências Humanas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

MADUENHO, L. P. e MARTINEZ, C. B. Acute effects of diflubenzuron on the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v.148, n. 3, p. 265-72, 2008.

MAINA, I. et al. α -glutathione S-transferase: A new biomarker for liver injury? *The Journal of Applied Laboratory Medicine*, v. 1, n. 2, p. 119-128, 2016.

MARTINEZ-LARA, E. et al. Glutathione-S-transferase isoenzyme patterns in the gilthead seabream (*Sparus aurata*) exposed to environmental contaminants. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, v. 113, n. 2, p. 215-220, 1996.

MARTINS, T.E.P. 2008. *Estudo comparativo da atividade catalítica e expressão protéica do citocromo P4501A (CYP1A) em cascudos (Loricariidae) e tilápias*

(*Cichlidae*). 122 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, 2008.

MATSUSHITA, M. e SOUZA, N. E. R. Resíduos de pesticidas organoclorados em algumas espécies de peixe comercial da planície de inundação do alto rio Paraná, região de Porto Rico (PR), Brasil. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, v. 37, p. 637-644, 1994.

MAXWELL, D.M. The specificity of carboxylesterase protection against the toxicity of organophosphorus compounds. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 114, p. 306-312, 1992.

MENEZES, C.C. et al. Roundup effects on oxidative stress parameters and recovery pattern of *Rhamdia quelen*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 60, p. 665–671, 2011.

MMA – Ministério do Meio Ambiente. *Segurança Química: Agrotóxicos*. Disponível em <<http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/agrotoxicos>>. Acesso em 25 mar. 2014.

MODESTO, K.A. e MARTINEZ, C.B.R. Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere*, v. 78, p. 294–299, 2010.

MORGAN, E.W. et al. Purification and characterization of two rat liver microsomal carboxylesterases (hydrolase A and B). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 315, p. 495-512, 1994.

MOURA, R. M. Agrotóxicos: heróis ou vilões? A face da questão que todos devem saber. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica*, v. 4, p. 23-49, 2007.

MURRAY, R. K. Metabolismo de Xenobióticos. In: *Harper: bioquímica ilustrada*. MURRAY, R. K., GRANNER, D. K. e RODWELL, V. W. (Orgs.). 27 ed. São Paulo: McGraw-Hiel, 2007.

PEREZ-LOPEZ, M. et al. Glutathione S-transferase cytosolic isoforms as biomarkers of polychlorinated biphenyl (Arochlor-1254) experimental contamination in rainbow trout. *Toxicology Letters*, v. 136, p. 97–106, 2002.

PETERSON, G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, v. 83, p. 346-356, 1977.

PIMPÃO, C. T. et al. Effects os deltamethrin on hematological parameters and enzymatic activity in *Ancistrus multispinis* (Pisces, Teleostei). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 88, p. 122- 127, 2007.

POTTER, V. R. e ELVEHJEM, C. A. A modified method for the study of tissue oxidations. *Journal of Biological Chemistry*, v. 114, p. 495-504, 1936.

RADIĆ, Z. et al. Three distinct domains in the cholinesterase molecule confer selectivity for acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors. *Biochemistry*, v. 32, p. 12074-12084, 1993.

REDINBO, M. R. e POTTER, P. M. Mammalian carboxylesterases: from drug targets to protein therapeutics. *Drug Discovery Today*, v. 10, n. 5, p. 313-325, 2005.

REINACH, F. Capítulo IX – Alimentação. In: *A longa marcha dos grilos canibais e outras crônicas sobre a vida do planeta Terra*. São Paulo: Companhia das Letras, p. 305-340, 2010.

RELYEA, R.A. The lethal impact of roundup on aquatic and terrestrial amphibians. *Ecological Applications*, v. 19, p. 276-276, 2009.

RIBALTA, C. et al. Hepatic biotransformation and antioxidant enzyme activities in Mediterranean fish from different habitat depths. *Science of the Total Environment*, v. 532, p. 176–183, 2015.

RIMA, I. H. 6 – As contribuições de Thomas Malthus à análise econômica. In: *História do pensamento econômico*. São Paulo: Atlas, p. 131-153, 1977.

ROCHA-SANTOS, C. et al. Glutathione peroxidase and glutathione S-transferase in blood and liver from a hypoxia-tolerant fish under oxygen deprivation. *Ecotoxicological and Environmental Safety*, v. 163, p. 604-611, 2018.

RODRIGUES, L. C. *Estudo das Glutation S-transferases hepáticas solúveis de peixes de água doce*. 2003. 106 f. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.

RUAS, C.B. et al. Oxidative stress biomarkers of exposure in the blood of cichlid species from a metal-contaminated river. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 71, n. 1, p. 86-93, 2008.

SALLES, J. B. *Colinesterase plasmática protetora de intoxicação do peixe piauçu por pesticidas organofosforados*. 2004. 70 f. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

SALLES, J.B. et al. A novel butyrylcholinesterase from serum of *Leporinus macrocephalus*, a Neotropical fish. *Biochimie*, v. 88, n. 1, p. 59–68, 2006.

SANCHES, S.M. et al. Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, v. 13, p. 53-58, 2003.

SANTOS, C. R. *Enzimas antioxidantes em sangue de peixes expostos à hipoxia e hiperoxia*. 2013. 101 f. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

SATOH, T. Toxicological implications of esterases – From molecular structures to functions. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 207, p. S11-S18, 2005.

SATOH, T. e HOSOKAWA, M. Structure, function and regulation of carboxylesterases. *Chemico-Biological Interactions*, v. 162, p. 195–211, 2006.

SILVA, E. S. 2013. *Carboxilesterase na adaptação do metabolismo de lipídios do pacu à hipóxia*. 74 f. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

SOLÉ, M. et al. Characterization of type “B” esterases and hepatic CYP 450 isoenzymes in Senegalese sole for their further application in monitoring studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 78, p. 72–79, 2012.

STEGEMAN, J.J. et al. Cytochrome P450 (CYP) in tropical fishes: catalytic activities, expression of multiple CYP proteins and high levels of microsomal P450 in liver of fishes from Bermuda. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 116C, p. 61-75, 1997.

THONGPRAKASANG, S. et al. Glyphosate induces human breast cancer cells growth via estrogen receptors. *Food and Chemical Toxicology*, v. 59, p. 129–136, 2013.

THOMPSON, H. M. et al. Species differences in avian serum B esterases revealed by chromatofocusing and possible relationships of esterase activity to pesticide toxicity. *Biochemical Pharmacology*, v.41, n. 8, p. 1235–1240, 1991.

VAN BRUGGEN, A.H.C. et al. Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Science of the Total Environment*, v. 616–617, p. 255–268, 2018.

VAN DER OOST, R. et al. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 13, p. 57-149, 2003.

VINCZE, K. et al. Impact of wastewater on fish health: a case study at the Neckar River (Southern Germany) using biomarkers in caged brown trout as assessment tools. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 22, p. 11822–11839, 2015.

WEINGARTNER, M. e ZANIBONI FILHO, E. Biologia e cultivo do dourado. In: BALDISSEROTTO, B. e GOMES, L.C. (Org). *Espécies Nativas para Piscicultura no Brasil*. 2 ed. Santa Maria: Editora UFSM. p. 245-281, 2010.

WARE, G.W. e WHITACRE, D.M. *The pesticide book*. 6 ed. EUA: MeisterPro Information Resources. p. 488. 2004.

WHEELLOCK, C.E. et al. Individual variability in esterase activity and CYP1A levels in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) exposed to esfenvalerate and chlorpyrifos. *Aquatic Toxicology*, v.74, p. 172-192, 2005a.

WHEELLOCK, C.E. et al. Overview of Carboxylesterases and Their Role in the Metabolism of Insecticides. *Journal of Pesticide Science*, v. 30, n. 2, p. 75–83, 2005b.

WHEELLOCK, C.E. et al. Applications of carboxylesterase activity in environmental monitoring and toxicity identification evaluations (TIEs). *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, p. 117–178, 2008.

WHITLOCK, J.P. Induction of cytochrome P4501A1. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 39, p. 103-125, 1999.

WHO – World Health Organization. International Programme on Chemical Safety – IPCS: *Risk assessment terminology*. Genebra, 2004.

WILLIAMS, G. M. et al. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 31, n. 2, p. 117-165, 2000.

ZAIDI, N. e SOLTANI, N. Laboratory evaluation of environmental risk assessment of pesticides for mosquito control: toxicity of dimilin on a larvivorous fish, *Gambusia affinis*. *Advances in Environmental Biology*, v. 7, n. 4, p. 605-613, 2013.

ZARRILLI, A. Bacia Platina: Rios, planícies e sociedades no Cone Sul. *RCC Perspectives*, n. 7, p. 41- 48, 2013.