



**CENTRO UNIVERSITÁRIO VILA VELHA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE**  
**ECOSSISTEMAS**

**ADRIANA CANAL DAS VIRGENS**

**Biomarcadores enzimáticos, hematológicos e histológicos  
em tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*, L.) em resposta  
à exposição ao acefato, difenoconazol e sulfluramida**

VILA VELHA  
2009

ADRIANA CANAL DAS VIRGENS

**Biomarcadores enzimáticos, hematológicos e histológicos em tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*, L.) em resposta à exposição ao acefato, difenoconazol e sulfluramida**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ecosistemas do Centro Universitário Vila Velha, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ecologia de Ecosistemas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Zilma Maria Almeida Cruz.

**VILA VELHA  
2009**

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

V816b Virgens, Adriana Canal das.

Biomarcadores enzimáticos, hematológicos e histológicos em tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*, L.) em resposta à exposição ao acefato, difenoconazol e sulfluramida / Adriana Canal das Virgens. – 2009.  
113 f.: il.

Orientador: Zilma Maria Almeida Cruz.

Dissertação (mestrado em Ecologia de Ecossistemas) - Centro Universitário Vila Velha, 2009.

Inclui bibliografias.

1. Pesticidas – aspectos ambientais. 2. Tilápia (Peixe). 3. Água – Poluição. 4. Toxicologia ambiental. 5. Ecossistema. I. Cruz, Zilma Maria Almeida. II. Centro Universitário Vila Velha. III. Título.

CDD 632.95

ADRIANA CANAL DAS VIRGENS

**Biomarcadores enzimáticos, hematológicos e histológicos em tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*, L.) em resposta à exposição ao acefato, difenoconazol e sulfluramida**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ecossistemas do Centro Universitário Vila Velha, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ecologia de Ecossistemas. Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Zilma Maria Almeida Cruz.

Aprovada em 16 de setembro de 2009.

COMISSÃO EXAMINADORA

-----  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Zilma Maria Almeida Cruz  
Centro Universitário Vila Velha (UVV)  
Orientadora

-----  
Prof. Dr. Ary Gomes da Silva  
Centro Universitário Vila Velha (UVV)

-----  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lílian Estrela Borges Baldotto  
Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF)

**Dedico este trabalho aos meus admiráveis e incansáveis PAIS  
Isaias Gomes das Virgens e Ana Maria Canal das Virgens,  
pelo amor incondicional e por sempre incentivar a lutar e  
a persistir para a concretização dos meus ideais.**

## AGRADECIMENTOS

A DEUS, que possibilitou mais esta conquista em minha vida.

Aos meus pais, que me apoiaram, incentivaram desde o início para esta Vitória.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Zilma Maria Almeida Cruz pela atenção, oportunidade, eficiência, incentivo, apoio, dedicação e confiança depositada durante estes anos de orientações as minhas atividades e pela paciência e amizade no tratamento para comigo, qualidades que com certeza alimentaram minha perseverança e que jamais irei esquecer .

Ao meu irmão e grande amigo Átila Canal das Virgens pela compreensão e carinho nesta caminhada.

À Ariana Candida Leandro amiga, companheira, compreensiva nas horas mais complicadas, muito obrigada pelo carinho, cumplicidade e que muito colaborou durante todos os experimentos e na tradução dos artigos.

A minha prima Prof<sup>a</sup>. Esp. em Letras Vanuza Canalli Rodrigues Mattos, pela disponibilidade de ler esta dissertação e auxiliar na revisão ortográfica.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Suely Gomes Figueiredo pela amizade, confiança e carinho depositada por anos, e por ceder os equipamentos para a realização do trabalho.

Aos meus colegas de trabalho do Complexo Biopráticas de Centro Universitário Vila Velha que sempre me incentivaram e que nunca deixaram faltar nada para a realização do meu trabalho: Margareth, Marlene, Paulo e em especial a Gustavo e Raíssa, que sempre seguraram as pontas e souberam lidar com as minhas ausências no laboratório e que tanto me ajudaram quando solicitados.

Ao meu “chefe” Prof. Dr. Rodrigo Roque Lesqueves de Castro pela ajuda no preparo do material de Microscopia e obtenção das imagens. Pela amizade, disponibilidade e por todas as contribuições feitas a este trabalho e que bastante me ajudou.

Ao Prof. Msc. Leandro Abreu Fonseca pela ajuda na execução e interpretação na parte de Hematologia e paciência nos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Alessandro Coutinho Ramos pelo incentivo e início das análises de dados, além de ceder seu Laboratório para as partes finais do experimento.

Ao Bruno Ferreira da Silva, Frederico Jacob Eutrópio e Celina Alcoforado dos Santos meus colegas de mestrado, pela troca de experiências, colaboração científica, convivência, companheirismo e amizade que certamente continuará por

toda nossa existência e que mesmo estando atarefados tiveram paciência em ensinar, e, que me aturaram até o fim.

Aos meus estagiários do Laboratório de Ciências Químicas, por colaborarem, apoiarem, ajudarem, rirem e sorrirem durante os trabalhos realizados e que tiveram muita paciência comigo, a minha eterna gratidão a Márcia, Lorena, Ralf, Gláucia, Mônica, Débora, Renata, Joyce e aqueles ausentes que sempre torceram por mim.

À Piscicultura Barra do Mangaraí gerenciada pelo Amilton, pela doação das tilápias.

Aos professores integrantes do Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ecossistemas do Centro Universitário Vila Velha, pela oportunidade de aperfeiçoamento e formação proporcionados.

Aos estagiários do Laboratório de Ecotoxicologia Aquática pela ajuda prestada na realização dos experimentos: Luciano, Michel, Lara, Luana, Marcão, Vitor e em especial a Antônio e Edgar que sempre estiveram presentes quando eram solicitados, pois lutamos juntos para realizar os experimentos da melhor forma possível.

Àqueles que sempre me incentivaram a nunca desistir, Jorge, Fabiana, Sidney, Vivian, Carolina, Manuel e Wisley.

Ao Prof. Msc. Fernando Fontes Barcellos pelas idas a área de estudo e pesquisa, as Prof<sup>a</sup>. Esp. Maria de Fátima Martino Ferreira Cardoso, e Dr<sup>a</sup>. June Ferreira Maia cujo apoio e palavras de incentivo não me deixaram desanimar frente às inúmeras dificuldades enfrentadas, as quais serviram de estímulo para seguir em frente.

Ao apoio técnico na elaboração das lâminas de histologia do Carlos Roberto Marcos.

Ao Centro Universitário Vila Velha pela concessão da bolsa de mestrado, favorecendo o desenvolvimento este trabalho.

E a todos aqueles que participaram direta ou indiretamente desta conquista, mas que minha memória falhou em lembrar.

“Todas as substâncias são venenosas; a dose correta diferencia o veneno do remédio”.

Paracelsus – Médico Suíço – 1493-1541.



## RESUMO

A crescente utilização de agrotóxicos e sua deposição nos ecossistemas aquáticos têm despertado interesses na comunidade científica, em compreender e avaliar os efeitos biológicos dessas substâncias nos vários organismos. Objetivou-se, neste trabalho, avaliar características enzimáticas, hematológicas e histológicas em tilápias (*Oreochromis niloticus*, L.) expostas ao acefato 1 mg/L, difenoconazol 3,7 mg/L e sulfluramida 0,3 g/L, por período de 96 h. As atividades de acetilcolinesterase (AChE), butirilcolinesterase (BChE), fosfatase alcalina (ALP) e glutathione S-transferase (GST) foram acompanhadas em diferentes tecidos da espécie, os estudos hematológicos referiram-se à contagem relativa de células sanguíneas de defesa orgânica, enquanto que a histologia de brânquias foram observadas nos vários tratamentos. Não foram observadas diferenças nos parâmetros físicos e químicos da água dos bioensaios e na biometria dos peixes, no entanto, alterações comportamentais foram detectadas quando os indivíduos foram submetidos aos tratamentos. Em relação às enzimas, nenhuma diferença significativa foi caracterizada para AChE e ALP em músculo, e para ALP em cérebro e brânquias. Entretanto, a GST de fígado, apresentou diferenças entre o controle, o difenoconazol e sulfluramida, que resultou em elevação de 98,7% e 97,5%, respectivamente, em sua atividade, enquanto que para o acefato, a resposta foi menos intensa (54,3%), porém significativa. Por outro lado, as brânquias responderam de forma significativa aos tratamentos com acefato (69,5%), difenoconazol (51,9%) e sulfluramida (33,2%), ao contrário das atividades em cérebro e músculo. Em relação a AChE nos diversos órgãos, ficou evidenciado significativa atividade no cérebro, brânquias e plasma dos indivíduos submetidos ao acefato, que apresentaram inibição maior quando comparado ao controle e aos outros tratamentos. A BChE por sua vez, apresentou maior diferença significativa nos ensaios com sulfluramida em cérebro, ao contrário dos observados em brânquias e plasma. O registro dos efeitos dos agrotóxicos sobre a ALP de intestino mostrou semelhança significativa para o difenoconazol e sulfluramida ao contrário do acefato. Diferenças significativas entre as células da série branca foram evidenciadas quando analisados o sangue de tilápias-do-Nilo, principalmente aquelas relacionadas aos neutrófilos e basófilos. Em relação às respostas histológicas branquiais, foi possível caracterizar esse órgão como bom

bioindicador devido às alterações observadas nos filamentos, o que interfere sobremaneira na fisiologia do indivíduo. O estudo dos biomarcadores na cinética enzimática, hematologia e histologia mostraram-se bastante útil, pois além de oferecer informações a respeito da toxicidade das amostras nos vários tecidos, possibilitou a caracterização dos efeitos adversos e a intensidade de cada um sobre a tilápia-do-Nilo, utilizada como bioindicador.

Palavras-chave: Agrotóxicos. Bioindicadores. Ecossistemas aquáticos. Ecotoxicologia aquática.

## ABSTRACT

The increasing use of pesticides and their deposition in aquatic ecosystems have stimulated interest in the scientific community to understand and evaluate the biological effects of these substances in various organisms. The aim of this study was to evaluate enzymatic characteristics, hematological and histological data of tilapia (*Oreochromis niloticus*) formerly exposed to acephate  $1 \text{ mg.L}^{-1}$ , difenoconazole  $3.7 \text{ mg.L}^{-1}$  and sulfluramid  $0.3 \text{ g.L}^{-1}$ , for a period of 96 h. The activities of acetylcholinesterase (AChE), butyrylcholinesterase (BChE), alkaline phosphatase (ALP) and glutathione S-transferase (GST) were monitored in different tissues of the species. Hematologic studies were carried out in order to estimate the relative count of blood cells. Furthermore the histology of gills after various treatments was observed. There were no differences in physical and chemical parameters of water from bioassays and biometrics in fish, however, changes in behaviour were detected when the individuals were submitted to treatment. For the enzymes, no significant differences were characterized for AChE and ALP in muscle, and ALP in brain and gills. The GST in liver, however, showed differences between the control group and the group formerly exposed to difenoconazole sulfluramid, resulting in an increase of 98.7% and 97.5%, respectively, in their activity, while for acephate, the response was less intense (54.3%) but significant. Moreover, the gills responded significantly to treatments with acephate (69.5%), difenoconazole (51.9%) and sulfluramid (33.2%), in opposite to activities in brain and muscle. For AChE in various organs, significant activity in the brain, gills and plasma of individuals subjected to acephate, which showed higher inhibition when compared to the control and other treatments. The BChE on the other hand, showed greater difference in the sulfluramid concentration in the brain, unlike those observed in gills and plasma. The record of the effects of pesticides on intestinal ALP unlike acephate showed significant similarity to difenoconazole and sulfluramid. Significant differences between the cells of white blood cells were observed when analyzed the blood of tilapia Nile, mainly resulting from changes in neutrophils and basophils. The histological examination of the gills has proven, that gills are bioindicators due to their pollution dependent changes.

For this study, enzyme kinetics, hematology and histology in tilapia Nile formerly exposed to different toxins were analysed. The data generated for this study indicate, that tilapia Nile can be used as bioindicator for pollution since some of the quantified parameters change in correlation to the amount of pollution.

Keywords: Pesticides. Bioindicators. Ecosystems. Aquatic Ecotoxicology.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Imagem via satélite da região agrícola localizada à margem da bacia hidrográfica do Rio Jucu.....	23
<b>Figura 2</b> - Mecanismo clássico de inibição da acetilcolinesterase por inseticidas organofosforados.....	28
<b>Figura 3</b> - Fórmula estrutural do acefato.....	28
<b>Figura 4</b> - Fórmula estrutural do difenoconazol.....	30
<b>Figura 5</b> - Fórmula estrutural da sulfluramida.....	31
<b>Figura 6</b> – Mecanismo de hidrólise da acetilcolina.....	35
<b>Figura 7</b> - Atividade da Acetilcolinesterase em cérebro de <i>Oreochromis niloticus</i> , submetidos ao acefato (A); difenoconazol (D) e sulfluramida (S), durante 96h.....	55
<b>Figura 8</b> - Atividade da Acetilcolinesterase em brânquias de <i>Oreochromis niloticus</i> , submetidas ao acefato (A); difenoconazol (D) e sulfluramida (S), durante 96h.....	56
<b>Figura 9</b> - Atividade da Acetilcolinesterase em plasma de <i>Oreochromis niloticus</i> , submetidas ao acefato (A); difenoconazol (D) e sulfluramida (S), durante 96h.....	58
<b>Figura 10</b> - Atividade da Acetilcolinesterase de músculo de <i>Oreochromis niloticus</i> , submetidas ao acefato (A); difenoconazol (D) e sulfluramida (S), durante 96h.....	59
<b>Figura 11</b> - Atividade da Butirilcolinesterase em cérebro de <i>Oreochromis niloticus</i> , submetidas ao acefato (A); difenoconazol(D) e sulfluramida (S), durante 96h.....	61
<b>Figura 12</b> - Atividade da Butirilcolinesterase em brânquias de <i>Oreochromis niloticus</i> , submetidas ao acefato (A); difenoconazol (D) e sulfluramida (S), durante 96h.....	62
<b>Figura 13</b> - Atividade da Butirilcolinesterase em plasma de <i>Oreochromis niloticus</i> , submetidas ao acefato (A); difenoconazol (D) e sulfluramida (S), durante 96h.....	64
<b>Figura 14</b> - Atividade da Fosfatase Alcalina em intestino de <i>Oreochromis niloticus</i> , submetidas ao acefato (A); difenoconazol (D) e sulfluramida (S), durante 96h.....	65

<b>Figura 15</b> - Atividade da Glutathione S-Transferase em fígado de <i>Oreochromis niloticus</i> , submetidas ao acefato (A); difenoconazol (D) e sulfluramida (S), durante 96h.....	67
<b>Figura 16</b> - Atividade da Glutathione S-Transferase de brânquias de <i>Oreochromis niloticus</i> , submetidas ao acefato (A); difenoconazol (D) e sulfluramida (S), durante 96h.....	69
<b>Figura 17</b> - Células sanguíneas de defesa orgânica em <i>Oreochromis niloticus</i> .....	70
<b>Figura 18</b> - Alterações nos índices hematológicos de neutrófilos em <i>Oreochromis niloticus</i> , submetidas ao acefato (A); difenoconazol (D) e sulfluramida (S), durante 96h.....	71
<b>Figura 19</b> - Alterações nos índices hematológicos de basófilos em <i>Oreochromis niloticus</i> , submetidas ao acefato (A); difenoconazol (D) e sulfluramida (S), durante 96h.....	71
<b>Figura 20</b> - Lamelas branquiais do controle de <i>O.niloticus</i> após 96 horas de bioensaio.....	74
<b>Figura 21</b> - Lamelas branquiais de <i>O.niloticus</i> submetidas ao acefato, durante 96h de bioensaio.....	74
<b>Figura 22</b> - Lamelas branquiais de <i>O.niloticus</i> submetidas ao difenoconazol, durante 96h de bioensaio.....	75
<b>Figura 23</b> - Lamelas branquiais de <i>O.niloticus</i> submetidas ao sulfluramida, durante 96h de bioensaio.....	75

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** - Parâmetros físicos e químicos da água. Temperatura (°C), oxigênio dissolvido (OD) e O<sub>2</sub> saturado nos tratamentos Controle, Acefato (1 mg/L), Difenoconazol (3,7 mg/L) e Sulfluramida (0,3 g/L).....52

**Tabela 2** - Peso corporal (g) e comprimento caudal (cm) de *O. niloticus* expostos aos tratamentos durante 96 h.....53

**Tabela 3** - Alterações histológicas observadas em *Oreochromis niloticus*, submetidas aos agrotóxicos.....73

## LISTA DE ABREVIATURAS

A - Acefato

AChE – Acetilcolinesterase

ALP – Fosfatase alcalina

ANVISA – Agencia Nacional de Vigilância Sanitária

BChE – Butirilcolinesterase

BSA – Albumina sérica bovina

C - Controle

CGE – Células granulócíticas especiais

ChE – Colinesterase

CNDB – 1-cloro – 2,4-dinitrobenzeno

CO – Monóxido de carbono

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

D - Difenoconazol

DTNB – Dithiobis- 2 nitrobenzoico acid

FAPES – Fundo de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo

FISPQ – Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos

GLU – Glutamato

GSH – Glutathiona reduzida

GST – Glutathiona S-Transferase

HIS – Histidina

OMS – Organização Mundial de Saúde

OP – Organofosforado

PChE – Propionilcolinesterase

pNPP – p-Nitrofenilfosfato

ERO – Espécies reativas de oxigênio

S – Sulfloramida

SER - Serina



## SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	10
LISTA DE FIGURAS.....	12
LISTA DE TABELAS.....	14
LISTA DE ABREVIATURAS.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	20
2 REVISÃO DA LITERATURA .....	24
2.1 BIOINDICADOR.....	24
2.2 AGROTÓXICOS.....	25
2.3 ORGANOFOSFORADOS.....	26
2.3.1 Inseticida Acefato.....	27
2.4 TRIAZÓIS.....	29
2.4.1 Fungicida Difenconazol.....	29
2.4.2 Absorção e Excreção em Animais de Laboratório.....	30
2.5 Inseticida Sulfluramida.....	30
2.5.1 Absorção e Excreção do Ingrediente Ativo.....	31
2.6 BIOMARCADORES.....	32
2.7 COLINESTERASES (ChEs) – ACETILCOLINESTERASE (AChE) E BUTIRILCOLINESTERASE (BChE).....	33
2.7.1 FOSFATASE ALCALINA (ALP).....	37
2.7.2 GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST).....	37
2.8 HEMATOLOGIA.....	38
2.9 HISTOLOGIA.....	39
3 OBJETIVOS.....	42

<b>3.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>42</b>
<b>3.2 Objetivos Específicos.....</b>	<b>42</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>43</b>
<b>4.1 Material.....</b>	<b>43</b>
<b>4.2 Aquisição e Aclimação do Animal.....</b>	<b>44</b>
<b>4.3 Protocolo Experimental.....</b>	<b>44</b>
<b>4.4 Obtenção de Extratos Utilizados para Estudos Cinéticos da Acetilcolinesterase.....</b>	<b>45</b>
<b>4.5 Obtenção de Extratos Utilizados para Estudos Cinéticos da Butirilcolinesterase.....</b>	<b>45</b>
<b>4.6 Obtenção de Extratos Utilizados para Estudos Cinéticos da Glutathione S-Transferase.....</b>	<b>46</b>
<b>4.7 Obtenção de Extratos Utilizados para Estudos Cinéticos da Fosfatase Alcalina.....</b>	<b>46</b>
<b>4.8 Preparação de Amostras e Procedimentos Hematológicos.....</b>	<b>47</b>
<b>4.9 Preparações Histológicas.....</b>	<b>47</b>
<b>4.10 Métodos Analíticos.....</b>	<b>48</b>
<b>4.10.1 Acetilcolinesterase.....</b>	<b>48</b>
<b>4.10.2 Butirilcolinesterase.....</b>	<b>48</b>
<b>4.10.3 Glutathione S-Transferase.....</b>	<b>48</b>
<b>4.10.4. Fosfatase Alcalina.....</b>	<b>49</b>
<b>4.11 Determinação da Proteína.....</b>	<b>49</b>
<b>4.12 Análise Estatística.....</b>	<b>49</b>
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
<b>5.1 Parâmetros físicos e químicos da água.....</b>	<b>51</b>
<b>5.2 Análise comportamental.....</b>	<b>52</b>
<b>5.3 Biometria.....</b>	<b>53</b>

<b>5.4 Atividade Enzimática em <i>Oreochromis niloticus</i>.....</b>	<b>54</b>
<b>5.4.1 Acetilcolinesterase (AChE EC 3.1.1.7) em cérebro.....</b>	<b>54</b>
<b>5.4.2 Acetilcolinesterase (AChE EC 3.1.1.7) em brânquias.....</b>	<b>55</b>
<b>5.4.3 Acetilcolinesterase (AChE EC 3.1.1.7) em plasma.....</b>	<b>57</b>
<b>5.4.4 Acetilcolinesterase (AChE EC 3.1.1.7) em músculo.....</b>	<b>58</b>
<b>5.4.5 Butirilcolinesterase (BChE EC 3.1.1.8) em cérebro.....</b>	<b>59</b>
<b>5.4.6 Butirilcolinesterase (BChE EC 3.1.1.8) em brânquias.....</b>	<b>61</b>
<b>5.4.7 Butirilcolinesterase (BChE EC 3.1.1.8) em plasma.....</b>	<b>63</b>
<b>5.4.8 Fosfatase Alcalina (ALP EC 3.1.3.1) em intestino.....</b>	<b>64</b>
<b>5.4.9 Glutaciona S-transferase (GST EC 2.5.1.18) em fígado.....</b>	<b>66</b>
<b>5.4.10 Glutaciona S-transferase (GST EC 2.5.1.18) em brânquias.....</b>	<b>67</b>
<b>5.5 Efeito dos Agroquímicos sobre os Parâmetros Hematológicos do <i>Oreochromis niloticus</i>.....</b>	<b>69</b>
<b>5.6 Análise Histológica das Brânquias de <i>Oreochromis niloticus</i>.....</b>	<b>72</b>
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>76</b>
<b>6.1 Variações físicas e químicas durante o teste de toxicidade.....</b>	<b>77</b>
<b>6.2 Estudo comportamental.....</b>	<b>78</b>
<b>6.3 Biometrias dos indivíduos.....</b>	<b>80</b>
<b>6.4 Alterações enzimáticas.....</b>	<b>80</b>
<b>6.5 Alterações hematológicas.....</b>	<b>90</b>
<b>6.6 Alterações histológicas.....</b>	<b>93</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>96</b>
<b>8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>98</b>
<b>9 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>99</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A biota aquática está constantemente exposta a um grande número de substâncias tóxicas lançadas no ambiente, oriundas de diversas fontes antrópicas. A descarga de resíduos tóxicos provenientes de efluentes industriais, os processos de drenagem agrícola, os derrames acidentais de resíduos químicos e os esgotos domésticos lançados em rios e mares contribuem para a contaminação dos ecossistemas aquáticos com uma ampla gama de agentes tóxicos como metais pesados, agrotóxicos, compostos orgânicos, entre outros (ARIAS et al., 2007).

Segundo Benincá (2006) e Silva et al., (2005) com a implantação da agricultura industrial, extensa área natural tem sido substituída por monoculturas, causando um grave desequilíbrio no solo e o desenvolvimento de plantas e insetos indesejáveis. Assim, passaram a ser utilizados diversos agroquímicos, entre fertilizantes e agrotóxicos, o que torna a agricultura uma das principais fontes de contaminantes aquáticos.

A busca por agrotóxicos menos persistentes no meio ambiente e mais potentes em relação às pragas promoveu o uso dos organofosforados e carbamatos. O largo uso desses compostos tem aumentado consideravelmente e está relacionado com sua baixa permanência no ambiente e durabilidade em comparação aos pesticidas organoclorados (STOPPELLI; MAGALHÃES, 2005; REZG, 2007). Esses produtos, quando aplicados sobre os campos de cultivo, podem atingir os corpos d'água, verduras, grãos, alimentos e outros produtos diretamente, através da água da chuva e da irrigação, ou indiretamente através da percolação no solo, chegando aos lençóis freáticos (ARIAS et al., 2007; REZG, 2007).

De acordo com Bernardes (2007), a bacia hidrográfica do Rio Jucu, localizada no Espírito Santo, abrange uma área de 2.200 km<sup>2</sup>, em que estão situados os municípios de Domingos Martins, Marechal Floriano, e ainda, parte de Viana, Vila Velha, Cariacica e Guarapari. Este rio possui dois formadores principais: Braço Norte e Braço Sul, tendo áreas de drenagem de 920 km<sup>2</sup> e 480 km<sup>2</sup>, respectivamente.

Segundo o Fundo de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES, 2006) e Coimbra (2006), a bacia é de grande importância econômica, social e histórica para o Estado uma vez que junto com a Bacia Hidrográfica do Rio Santa Maria da Vitória é responsável por 100% do abastecimento de água da Grande Vitória num raio de 50 km, região que abriga cerca de 50% da população do Estado, bem como um expressivo complexo industrial e comercial, e na bacia desse rio estão situadas diversas Unidades de Conservação (COIMBRA, 2006).

O uso do solo na bacia é predominantemente agropecuário e o Rio Jucu está extremamente poluído, contaminado por esgotos sanitários não tratados e resíduos de agrotóxicos (COIMBRA, 2006; BERNARDES, 2007). Na produção de hortaliças têm sido empregadas quantidades indiscriminadas de agrotóxicos, acarretando problemas de intoxicação de produtores rurais, presença de resíduos nos vegetais e contaminação da água e do solo. Isto se deve ao fato destas culturas serem vulneráveis à ação de pragas e doenças além de apresentarem ciclo curto de vida (ARAÚJO et al., 2001).

Os agroquímicos utilizados no presente trabalho foram acefato, difenoconazol e sulfluramida, cujas escolhas e concentrações foram embasadas naqueles utilizados nos campos agrícolas da região da bacia hidrográfica do Rio Jucu, ver Figura 1.

A histologia é atualmente uma das ferramentas utilizada para determinar, em peixes, os danos causados pela exposição a diferentes poluentes, enquanto que alterações hematológicas contribuem para compreensão de variações das características sanguíneas em relação a fatores como posição filogenética, hábitos ecológicos, seleção alimentar e meio de vida (TAVARES-DIAS; MATAQUEIRO, 2004).

Por outro lado, os biomarcadores enzimáticos frequentemente utilizados em estudos de ecotoxicidade, são as enzimas acetilcolinesterase (AChE), glutatona S-transferase (GST), fosfatase alcalina (ALP) e, eventualmente, butirilcolinesterase (BChE). AChE e BChE são biomarcadores importantes para a determinação dos

efeitos biológicos de contaminantes neurotóxicos em habitats aquáticos e na monitorização da poluição ambiental (ZHOU et al., 2007; YADAV et al., 2009).

A GST pertence a uma família de enzimas que participam da Fase II do processo de desintoxicação, e catalisa a conjugação da glutathiona reduzida com xenobióticos, incluindo os agrotóxicos organofosforados. Alteração na atividade da fosfatase alcalina (ALP) em tecidos também é relatada em peixes submetidos a agentes impactantes (ZHOU et al., 2007).

Considerando o uso intensivo dos agroquímicos nessa região do Estado, o presente trabalho teve como objetivo avaliar, em tilápias, as alterações nas células de defesas sanguíneas, as alterações histológicas em brânquias e as atividades enzimáticas de AChE, BChE, ALP e GST em diferentes órgãos, para estabelecer o grau de danos causados pelos agrotóxicos acefato, difenoconazol e sulfluramida.



Figura 1: Imagem via satélite da região agrícola localizada à margem da bacia hidrográfica do Rio Jucu. (Fonte: Google Earth, 2009)

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

Os poluentes orgânicos, provenientes de várias fontes antrópicas são, objeto de grande interesse mundial, por serem responsáveis pelos efeitos adversos ao homem e aos ecossistemas (MAYBECK; CHAPMAN; HELMER, 1990). Segundo Petts e Calow (1966), a presença de poluentes e seus derivados no meio aquático podem ser detectados por meio dos efeitos que causam nos organismos, utilizados como bioindicadores, e os resultados estão relacionados à capacidade desses organismos em responderem ao estresse ambiental. Existem vários métodos utilizados como instrumentos de controle da qualidade da água e, a tilápia, é organismo largamente usado nos testes de toxicidade (PETTS; CALOW, 1966).

### 2.1 BIOINDICADOR

As tilápias são nativas do continente africano e da Ásia menor, caracterizadas como espécies exóticas invasoras (MEURER et al., 2007; IGARANSKI, acesso em 13 nov. 2007) e uma das mais criadas no mundo (AZEVEDO et al., 2006; MEURER et al., 2007; MONTEIRO et al., 2009).

Segundo Monteiro et al., (2009), a tilápia – do – Nilo (*Oreochromis niloticus*) é um teleosteo com resistência à alta temperatura e não sobrevive em baixa tensão de oxigênio ou elevada concentração de amônia (MEURER et al., 2007), o que a torna uma das espécies mais cultivadas em regiões tropicais e subtropicais (SANTOS et al., 2007).

Por outro lado, devido a algumas características do peixe, tais como, fácil manuseio, fácil manutenção em laboratório e fácil resposta às alterações ambientais, a espécie tem se mostrado um bom modelo para pesquisas toxicológicas (MONTEIRO et al., 2009), pelo fato de responder de forma similar aos



grandes vertebrados, nos estudos do potencial carcinogênico e teratogênico de determinadas substâncias químicas (CRUZ; NETO; MENEZES, 2004).

## 2.2 AGROTÓXICOS

Os agrotóxicos são substâncias utilizadas no controle de pragas, no controle das doenças de plantas e ainda como fator para o aumento da produtividade agrícola. O crescimento da população e a necessidade de maior produção alimentar tornam essencial o uso de pesticidas como forma de proteger as culturas em suas várias fases, como crescimento, armazenagem e transporte (BHANTI; TANEJA, 2007; EI-SAYED; SAAD; EI-BAHR, 2007; MELO et al., 2008).

Segundo Silva, Cardeal e Carvalho (1999), a aplicação indiscriminada de agrotóxicos no campo tem originado graves problemas de contaminação (BHANTI; TANEJA, 2007), o que tem se tornado uma grande preocupação à comunidade científica, principalmente ao ser considerado o uso desse recurso hídrico para consumo humano (VEIGA et al., 2006). Embora substância de rápida degradação, (VIARENGO et al., 2007), sempre existe a possibilidade da permanência, no ambiente aquático, de resíduos e subprodutos, em concentrações ainda nocivas para o consumo humano. A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda como 0,1 mg/L o valor máximo permitido em água, para cada pesticida, e em 0,5 mg/L para o total de pesticidas (PERES et al., 2005).

Du et al., (2007) consideram importante o desenvolvimento de novos pesticidas sob o aspecto da elevada eficiência e baixo teor residual, como substitutos para os atuais. A utilização dos agrotóxicos no meio rural brasileiro tem resultado em conseqüências danosas, tanto para o ambiente como para a saúde da população rural (BARBIERI, 2006), e estão relacionados a vários fatores, entre os quais, seu uso indiscriminado, elevada toxicidade, ausência de informações sobre a saúde, precariedade da vigilância etc., agravados ainda por determinantes de ordens cultural, social e econômica (PERES et al., 2005).

Ressalta-se que a manifestação de um efeito tóxico pode ocorrer em local distante daquele de origem (AZEVEDO; CHASIN, 2004), e esses efeitos podem tornar-se agudos em pequenos rios e riachos, gerando problemas nesses ecossistemas aquáticos (TAKAHASHI et al., 2007). Muitos contaminantes ambientais são misturas de produtos químicos, que podem causar efeitos tóxicos sinérgicos ou antagônicos em diferentes organismos aquáticos (YADAV et al., 2009). Além disso, há que se considerar, que mesmo com meia-vida reduzida, a persistência de alguns agroquímicos no ambiente está relacionada ao uso contínuo (VEIGA et al., 2006), o que gera a necessidade de constantes avaliações nos organismos que vivem no ambiente (VIARENGO et al., 2007).

## 2.3 ORGANOFOSFORADOS

Nas duas últimas décadas, os organofosforados (OP) são os agrotóxicos mais utilizados em substituição aos organoclorados (BASIRI et al., 2007; ZHANG et al., 2008). A letalidade aguda dessa substância se deve à inibição de esterases, dentre as quais, a acetilcolinesterase (AChE), enzima vital para a normalidade da função nervosa (KRALJ et al., 2007; BASIRI et al., 2007). A elevada utilização dos OP dizima não somente as espécies-alvo, mas afetam principalmente mamíferos, aves e peixes (SANCHO; FERRANDO; ANDREU, 1997; BASIRI et al., 2007).

A maioria das formulações comerciais são tio-organofosforados, facilmente oxidados a compostos mais polares e inibidores mais potentes (KRALJ et al., 2007). A ação tóxica do OP está relacionada à sua habilidade em se ligar, irreversivelmente, à serina do centro catalítico da acetilcolinesterases (AChE), (Figura 2) (SANTOS et al., 2007), bloqueando a formação do transmissor colina (DU et al., 2007). Os OP bloqueiam ainda o éster carboxílico das hidrolases quimotripsina, butirilcolinesterase (BChE), carboxilesterase, paraoxonases e outras esterases do organismo. A constatação de efeitos colinérgicos e de hiperglicemia tem sido relatada como resultados adversos da intoxicação por OP tanto em humanos como em animais (BASIRI et al., 2007).

Por outro lado, estudos realizados com fenitroion resultaram em significativa elevação da glicemia, do lactato no fígado, nas brânquias e no sangue, com redução expressiva de proteínas, porém sem alteração do glicogênio hepático, após exposição do peixe enguia-européia (*Anguilla anguilla*) ao organofosforado (RUDNICKI, 2004).

Em relação aos parâmetros bioquímicos, pode ser citada a exposição do peixe tambuatá (*Callichthys callichthys*) a concentração subletal do organofosforado Folidol® 600, que resultou em 90% de inibição da acetilcolinesterase logo nas primeiras 4 horas, mantendo-se constante ao longo das 96 horas de exposição (RUDNICKI, 2004). Entretanto, uma redução progressiva na atividade da AChE de cérebro de *Oreochromis niloticus* foi relatada por Rudnicki (2004) quando os indivíduos foram submetidos à exposição aguda de monocrotofós (OP), enquanto que no peixe *Channa punctatus*, as alterações metabólicas observadas foram relacionadas à hipoglicemia e diminuição das concentrações de glicogênio hepático e muscular (RUDNICKI, 2004).

### 2.3.1 Inseticida Acefato

O acefato (O, S-dimetill acetilfosforamidotoato) é o princípio ativo pertencente à classe inseticida acaricida sistêmico de contato e ingestão, que integra o grupo químico dos organofosforados, como demonstrado na Figura 3 (ANVISA, acesso em 14 jul. 2009). A aplicação da substância é realizada nas partes aéreas das culturas de algodão, amendoim, batata, brócolis, citros, couve, fumo, pimentão, rosa, soja e tomate, e, entre outros, é também empregado no controle de pragas de plantas ornamentais em vasos e jardins residenciais não comerciais (CAMPOS, 2003). O acefato é inibidor da acetilcolinesterase, o que provoca a passagem contínua dos impulsos nervosos, levando o inseto à fadiga e conseqüentemente à morte (ARYSTA LIFESCIENCE, acesso em 14 jul. 2009).

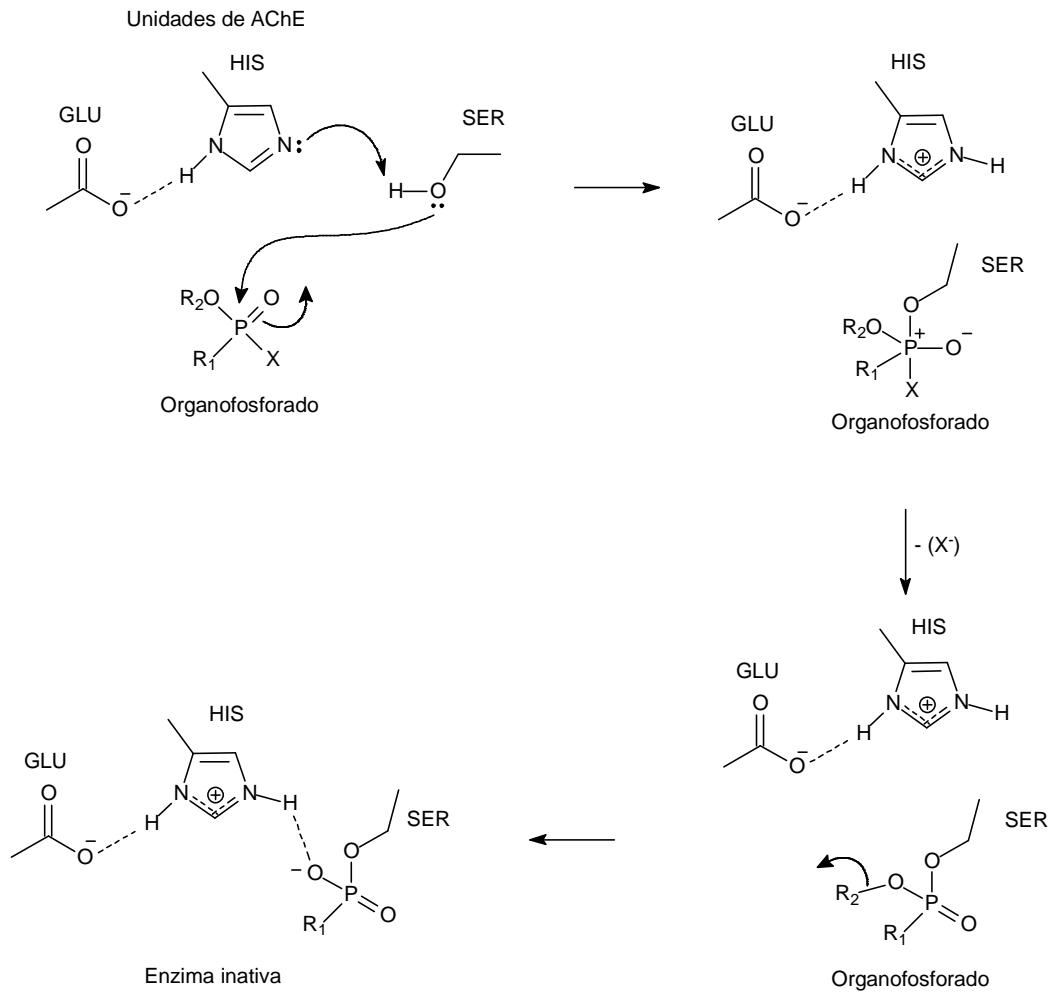


Figura 2: Mecanismo clássico de inibição da acetilcolinesterase por inseticidas organofosforados. (Fonte: adaptado de Santos et al., 2007).

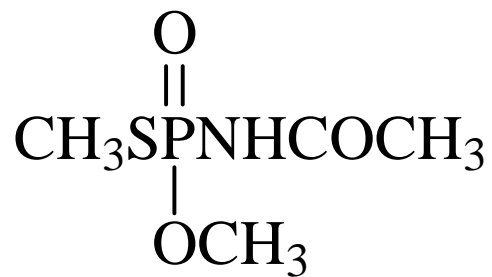


Figura 3 - Fórmula estrutural do acefato. (Fonte: ANVISA, 2009).

Estudos realizados em ratos submetidos ao acefato radiomarcado, demonstraram a rápida e total absorção no estômago e rápida excreção urinária. Durante as primeiras 6 horas do ensaio, aproximadamente 87% do composto foi excretado enquanto que 95% do total foram determinados somente ao final de 12 horas. A quase totalidade do produto remanescente foi encontrada no ar exalado em CO (1.0 – 4.5%), fezes (1.0%), e tecidos (0.4%) (ANVISA, acesso em 14 jul. 2009).

## 2.4 TRIAZÓIS

Os fungicidas são empregados no controle de doenças causadas por fungos, bactérias ou algas, porém alguns desses compostos inibem, temporariamente, o crescimento dos fungos. O uso de fungicidas vem sendo intensificado, principalmente em culturas de soja, algodão e milho (KONWICK et al., 2006; JULIATTI, acesso em 13 jul. 2009). Os triazóis são inibidores da demetilação, etapa na síntese do ergosterol, um dos principais componentes da parede celular de fungos pertencentes ao grupo dos ascomicetos, basidiomicetos e deuteromicetos. Entretanto, os fungos pertencentes ao grupo dos ficomicetos (atualmente denominados de oomicetos) obtêm ergosterol da planta hospedeira, tornando-se imunes à ação do fungicida, o que impede o uso do fungicida no controle de míldios, de requeima (*Phytophthora*), tombamento de plantas (*Pythium* spp.), míldio da videira (*Plasmopara viticola*), míldio da soja (*Peronospora manshurica*) etc. (GASSEN, acesso em 13 jul. 2009).

### 2.4.1 Fungicida Difenconazol

O difenoconazol (cis-trans-3-cloro-4-[4-metil-2-(1H-1,2,4-triazol-1ilmetil)-1,3-dioxolan-2-il] fenil 4-clorofenil éter) é o princípio ativo da classe fungicida e recomendado para controle de doenças em culturas de alface (Septoriose), banana (Sigatoka-amarela e negra), morango (Mancha-de-Mycosphaerella), etc. O composto integra o grupo químico triazol, Figura 4 (SIGMA-ALDRICH, acesso em 13 jul. 2009), e provoca o rompimento da parede celular, controlando dessa forma, o crescimento de diferentes classes de fungos (SYNGENTA, acesso em 12 jul. 2007).

### 2.4.2 Absorção e Excreção em Animais de Laboratório

Estudos realizados em laboratório possibilitaram caracterizar a absorção do difenoconazol no trato intestinal dos animais, além de acompanhar o metabolismo e eliminação dos seus catabólitos. Não foram detectadas acumulações do composto nos tecidos animais, e estudos com difenoconazol radiomarcado, em ratos, demonstraram uma recuperação acima de 98%, em 96 horas. O processo degradativo do composto inclui hidrólise, redução e hidroxilação do anel fenil (externo), produzindo triazol livre e o ácido carboxílico derivado do éter difenílico (SYNGENTA, acesso em 12 jul. 2007).

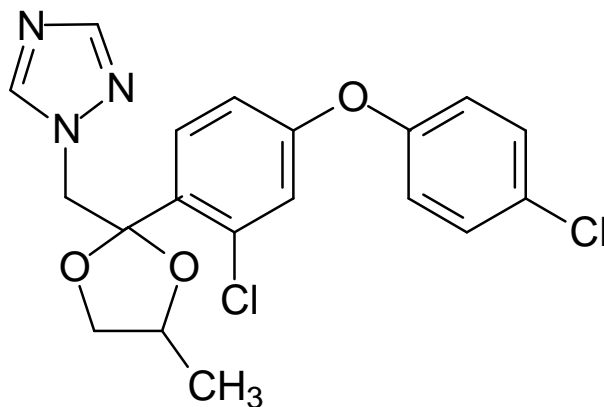


Figura 4: Fórmula estrutural do difenoconazol. (Fonte: Sigma-Aldrich®, 2009).

### 2.5 Inseticida Sulfloramida

O sulfloramida (N-etil-perfluorooctano Sulfonamida) é o princípio ativo da classe inseticida formicida, que atua no processo da fosforilação oxidativa (LARANJEIRO; ZANÚNCIO, 1995), Figura 5. A substância é utilizada no controle das formigas cortadeiras Saúva-limão (*Atta sexdens rubropilosa*), cabeça-de-vidro (*Atta laevigata*), saúva-parda (*Atta capiguara*), quenquéns (*Acromyrmex*) (UNIBRÁS, acesso em 14 jul. 2009), cupins (ANVISA, acesso em 14 jul. 2009) e baratas em residências. O produto é seguro, de baixa persistência no ambiente, integra o grupo químico sulfonamida fluoroalifática (ANVISA, acesso em 14 jul. 2009), além de apresentar

degradação de 42,59% em 28 dias, quando comparado com o dodecacloro, com meia-vida de 5 a 12 anos (LARANJEIRO; ZANÚNCIO, 1995). Entretanto, o produto pode ser tóxico para peixes, algas, microcrustáceos, minhocas, aves e abelhas (MILENIA, acesso em 14 jul. 2009).

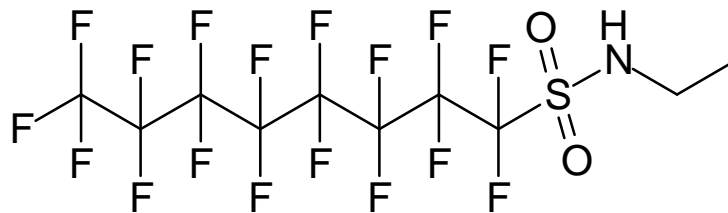


Figura 5: Fórmula estrutural da sulfluramida. (Fonte: [www.chemblink.com](http://www.chemblink.com)).

### 2.5.1 Absorção e Excreção do Ingrediente Ativo

Estudos realizados em ratos demonstraram a rápida transformação da Sulfluramida em DESFA (perfluorooctano sulfonamida), que apresenta função citotóxica por afetar o mecanismo de fosforilação oxidativa. A absorção no trato gastro-intestinal é lenta e eliminada, em 72 h, no ar expirado (56%), nas fezes (25%) e na urina (8%). Efeitos agudos e crônicos são caracterizados por: perda de apetite, diarreia moderada e cansaço. Segundo a Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos (FISPQ, 2006) não são conhecidos os efeitos de intoxicação do sulfluramida. A persistência do produto, no meio ambiente, provoca toxicidade em peixes (*Brachydanio rerio*) CL50 (96hs) = 2,66 mg/L; aves: (Codornas adultas) DL50 = 237,20 mg/kg; minhocas: (*Eisenia foetida*) CL50 (14 dias) = 1.565,14 mg/kg; algas: (*Selesnatrum capricornutum*) CE50 (96 hs) = 87,1 mg/L; microcrustáceos: (*Daphnia similis*) CE50 (48 hs) = 169,04 µg/L e para abelhas: (*Apis mellifera mellifera*) DL50 (24 hs) > 20µg/abelha.

## 2.6 BIOMARCADORES

A crescente utilização de agrotóxicos e sua deposição nos ecossistemas aquáticos têm despertado nos pesquisadores, as necessidades de compreender e avaliar os efeitos biológicos dessas substâncias nos vários organismos. Neste sentido, os estudos são realizados com biomarcadores, ferramenta importante na avaliação da toxicidade desses compostos, visando os vários níveis da organização biológica (ALPUCHE-GUAL; GOLD-BOUCHOT, 2008). Biomarcadores celulares atuam como sinalizadores do estresse em organismos expostos à contaminação ambiental. A caracterização do estresse e seus efeitos consideram as variações de tempo de exposição x concentrações de poluentes no organismo teste (VIARENGO et al., 2007).

Um bom exemplo do desenvolvimento do estresse é a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), que causam a peroxidação lipídica, a inativação de proteínas e danos ao DNA. Marcadores bioquímicos de estresse oxidativo incluem a síntese de enzimas antioxidantes e modificação oxidativa de proteínas. Processos de desintoxicação e antioxidação, catalisados pela glutathione S-transferase (GST) constituem um bom parâmetro na caracterização do estresse ambiental em mexilhões (PREVODNIK et al., 2007). De acordo com Melo et al. (2008), peixes são largamente utilizados em estudos dos efeitos tóxicos dos OP sobre a biota de água doce e marinha, e as atividades enzimáticas são importantes indicadores dos efeitos tóxicos, dessa substância, nesses indivíduos (ATLI; CANLI, 2007).

A utilização de salmonete (*Mullus* sp.), solha-das-pedras (*Platichthys flesus* L.) e peixe-carneiro europeu (*Zoarces viviparus*), em programas de monitoramento é muito importantes, apesar do elevado valor comercial do peixe e da sua posição na cadeia trófica (VIARENGO et al., 2007). Os moluscos, por sua vez, são mundialmente utilizados como organismos sentinela em programas de biomonitoramento, pelo fato de reter, parcialmente, o poluente na célula de formas não-tóxica. A variação na concentração nos tecidos depende do grau de desenvolvimento do indivíduo. A instalação do efeito de stress oxidativo ocorre



quando a produção das espécies reativas de oxigênio (ERO) ultrapassa a capacidade do organismo em neutralizar sua ação, apesar dos organismos se adaptarem ao stress pela elevação do seu potencial antioxidante (SIES, 1993).

A avaliação dos riscos ecotoxicológicos causados por agrotóxicos está baseada na toxicidade e nos efeitos dessas substâncias sobre organismos não-alvo, como os peixes (EL-SAYED; SAAD; EL-BAHR, 2007). Vários estudos têm mostrado que a produção celular de ERO e outros pró-oxidantes se elevam quando animais são expostos a ambientes contaminados, principalmente com derivados halogenados, metais pesados, nitroaromáticos, nitroaminas, herbicidas entre outros (RAO, 2006; LUSHCHAK, 2006; ROMERO; ANSALDO; LOVRIH, 2006; VALDIVIA et al., 2006). Algumas enzimas neutralizam as EROs, antes dos mesmos iniciarem o processo deletério celular e os diferentes tecidos respondem, de forma distinta, ao stress oxidativo.

Segundo Nascimento, Sousa e Nipper (2002), uma forma de minimizar as dificuldades no prognóstico, no diagnóstico e no monitoramento ambiental é utilizar testes com espécie-chave para o ecossistema em risco.

## 2.7 COLINESTERASES (ChEs) – ACETILCOLINESTERASE (AChE) e BUTIRILCOLINESTERASE (BChE)

As colinesterases (ChEs) são os biomarcadores mais utilizados na avaliação dos efeitos de exposição de organismos, à vários pesticidas organofosforados e carbamatos (ALPUCHE-GUAL; GOLD-BOUCHOT, 2008). Segundo Viarengo et al., (2007), as colinesterases, nos vertebrados, constituem uma classe de serina hidrolases e compreendem duas isoenzimas: acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE), também denominada pseudocolinesterase ou colinesterase não-específica ChE (LA TORRE; FERRARI; SALIBIÁN, 2002; LI, 2008; VARÓ; AMAT; NAVARRO, 2008), já que difere em sua especificidade para com o substrato. Por um lado, a hidrólise da acetilcolina pela AChE é mais rápida quando

comparada com outros ésteres colina, ao contrário da BChE, que apresenta eficiência tanto para butirilcolina quanto da acetilcolina (VIARENGO et al., 2007). Nos peixes, AChE predomina no cérebro e tecidos musculares, enquanto que a BChE está presente principalmente no fígado e plasma (LA TORRE; FERRARI; SALIBIÁN, 2002; ALPUCHE-GUAL; GOLD-BOUCHOT, 2008).

As ChEs têm sido frequentemente caracterizadas, em invertebrados, como enzimas polimórficas. Duas formas de ChEs foram identificadas em *Ostrea edulis* (Bivalves) e *Mytilus* spp. (Bivalves), a AChE e BChE, enquanto que a AChE e propionilcolinesterase (PChE) foram encontrados em *Corbicula fluminea* (VIARENGO et al., 2007). As atividades esterásicas observadas em *O. edulis* foram estabelecidas para AChE, BChE e PChE (VIARENGO et al., 2007) e, uma forma de avaliar a diferença de atividade de AChE nesse organismo é utilizar o inibidor paraoxon, inibidor da AChE, e calcular a diferença entre atividade total da AChE e a atividade da enzima inibida (VIARENGO et al., 2007). As colinesterases sanguíneas são enzimas inibidas irreversivelmente (AZEVEDO; CHASIN, 2004) na presença de agrotóxicos das classes dos organofosforados (PERES et al., 2005), o que a torna excelente parâmetro de avaliação da exposição ou da intoxicação por esses compostos (AZEVEDO; CHASIN, 2004).

De acordo com Rao (2006) e Viarengo et al., (2007), a acetilcolinesterase é responsável pela degradação do neurotransmissor acetilcolina na sinapse colinérgica de vertebrados e invertebrados, facilitando assim a transmissão de impulsos nervosos de um neurônio colinérgico para o próximo, e importante ferramenta no campo da toxicologia (VARÓ; AMAT; NAVARRO, 2008; YADAV et al., 2009), (Figura 6).

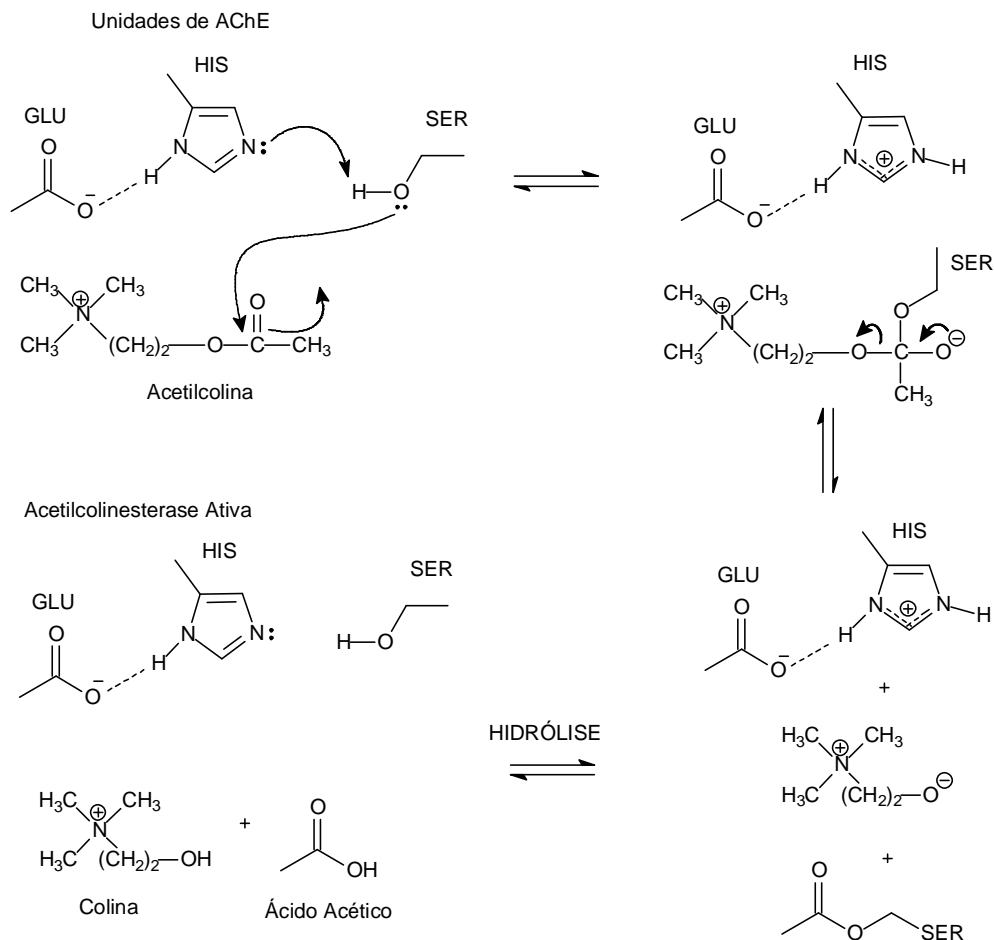


Figura 6: Mecanismo de hidrólise da acetilcolina. (Fonte: adaptado Santos et al., 2007).

Ainda segundo Cavaliere et al., (1996) e Rao (2006), a inibição da enzima pelo pesticida organofosforado causa acumulação da acetilcolina nos terminais sinápticos no sistema nervoso central e periférico com subsequente estimulação contínua dos receptores colinérgicos (AZEVEDO; CHASIN, 2004; SILVA et al., 2007; VARÓ; AMAT; NAVARRO, 2008) na membrana pós-sináptica, podendo levar à morte (SANCHO; FERRANDO; ANDREU, 1997).

Por outro lado, a função fisiológica da BChE está bem estabelecida, principalmente pelo fato de sua inibição não resultar em efeitos farmacológicos mesmo apresentando ampla distribuição em fígado, coração, cérebro, endotélio vascular, plasma e sistema nervoso. Essa distribuição pode sugerir diversos papéis para a

enzima, já que é capaz de hidrolisar compostos hidrofóbicos e hidrofílicos e ainda apresentar atividade anticolinérgicos (LA TORRE; FERRARI; SALIBIÁN, 2002; VIARENGO et al., 2007).

Porém, na prática, é importante caracterizar uma espécie bioindicadora, que seja abundante no tecido em questão, o que possibilita definir substratos e concentrações adequados para efeitos de controle (ALPUCHE-GUAL; GOLD-BOUCHOT, 2008). Essa caracterização de ChEs é importante pela grande variação de atividade nos vários órgãos e nas várias espécies (ALPUCHE-GUAL; GOLD-BOUCHOT, 2008), além de ser técnica de baixo custo pois utiliza método já padronizado por Ellman et al. (1961) considerado referência em toxicologia (FARIA; FASSA; FACCHINI, 2007; VIARENGO et al., 2007).

Quando o bioindicador é mexilhões, como no caso de *O. edulis* e *Crassostrea gigas*, as atividades colinesterásicas são determinadas em brânquias ou em homogenato total do corpo (VIARENGO et al., 2007), apesar do bivalves *Tapes philippinarum*, apresentarem baixa ou ausência de atividade quando ensaiada segundo metodologia usual (VIARENGO et al., 2007).

Entretanto, a AChE é importante biomarcador de exposição para vertebrados, de peixes até mamíferos (VIARENGO et al., 2007), apresentando sensibilidade em baixas concentrações de pesticidas, ao contrário de *Mytilus* sp., própria para exposição em elevadas concentrações, o que a torna essencial para estudos que visem os efeitos neurotóxicos (YADAV et al., 2009).

Estes resultados consideram ser a AChE de molusco um biomarcador de estresse de baixa sensibilidade além de estar relacionado a atividades como: alterações no ciclo da válvula de encerramento, espaçamento da brânquia, movimentos musculares etc., ao contrário do biomarcador de estresse de elevada sensibilidade de exposição nos vertebrados (VIARENGO et al., 2007).

### 2.7.1 FOSFATASE ALCALINA (ALP)

Uma cascata de fenômenos mediada por atividades enzimáticas, como as fosfatases, pode ser observada quando peixes de água doce são expostos a poluentes (RAO, 2006; ATLI; CANLI, 2007; BORKOVIC et al., 2008). A fosfatase alcalina é uma enzima polifuncional que hidrolisa uma série de substratos fosfomonoésteres, em pH alcalino, além de atuar em reações de tranfosforilação (DONACHY et al., 1990; BLASCO et al., 1993). Vários estudos têm descrito uma importante função da ALP no processo de mineralização do esqueleto de animais aquáticos (DONACHY et al., 1990; OLSEN et al., 1991; BLASCO et al., 1993) e na síntese de proteínas associadas à atividade secretora (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004). Por outro lado, a atividade observada no intestino, está envolvida com a absorção de nutrientes como lipídeos, glicose, cálcio e fósforo (ATLI; CANLI, 2007).

### 2.7.2 GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST)

A Glutathiona S-Transferase pertence a uma família multigênica de enzimas diméricas, principalmente citosólicas, com importante função na fase II dos processos de biotransformação e detoxificação de grande variedade de compostos eletrofílicos, ao catalisar a conjugação, desses compostos, com a glutathiona reduzida (GSH) (MARTINEZ-ALVAREZ; MORALES; SANZ, 2005).

Rao (2006) chegou à conclusão de que a subexposição aguda de tilápia ao organofosforado RPR-II, afeta o metabolismo intermediário cuja resposta é a elevação, entre outros, do biomarcador GST, indicando necrose em tecidos alvos. Entretanto, ao que parece a enzima desempenha, nos insetos, papel importante já primeira fase de desintoxicação de vários pesticidas (EGAAS, 2000).

Muitos autores admitem que a resposta dos organismos aquáticos a um ambiente adverso, está relacionada à capacidade desses organismos responderem aos efeitos tóxicos das espécies reativas do oxigênio (ERO), que são geradas em várias

situações de estresse (FITZPATRICK et al., 1997; HOARAU et al., 2001; ALMEIDA et al., 2007; VIARENGO et al., 2007).

Por sua vez, a concentração de GST pode ser utilizada como biomarcador biológico do estresse oxidativo provocado pelo aumento na geração de ERO como  $H_2O_2$ ,  $O_2^-$  e neste caso, a alteração na concentração da enzima está relacionada à resposta da peroxidação lipídica da membrana celular (VIARENGO et al., 2007).

Em particular, a GST tem sido freqüentemente utilizada em estudos de laboratório e programas de biovigilância para peixes e mariscos, cujas atividades enzimáticas mostram-se adequadas no acompanhamento dos efeitos dos poluentes sobre organismos sentinela. A resposta enzimática, em muitos casos é bifásica, mostrando uma tendência inicial de aumento em resposta à ativação do processo de síntese, seguido por uma diminuição na atividade enzimática e, por esta razão, ensaios com enzima devem estar associados a outros biomarcadores, o que permite a interpretação correta do significado fisiológico da função antioxidante desses alertas enzimáticos (ALMEIDA et al., 2007; VIARENGO et al., 2007).

## 2.8 HEMATOLOGIA

Condições ambientais mórbidas para populações de peixes podem ser avaliadas por análise dos padrões hematológicos (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004), como também por análises histológicas em tecidos de brânquias (WINKALER et al., 2001; ROMÃO et al., 2006).

A avaliação de cada componente sanguíneo e as funções que desempenham na manutenção da homeostase, é fator importante para o estabelecimento de condições adversas no ambiente e a forma com que interferem na fisiologia do indivíduo (AZEVEDO et al., 2006). Vários pesquisadores avaliaram as características hematológicas de *Oreochromis niloticus*, em ensaios desenvolvidos no laboratório,

em condições de estresse ambiental, o que facilitou o diagnóstico de doenças em peixes, todos relacionados às condições adversas do bioensaio (UEDA et al., 1997; EL-SAYED; SAAD; EL-BAHR, 2007; GLUSCZAK, 2008).

Apesar da importância da hematologia em estudos das condições ambientais, pouco se conhece sobre peixes teleósteos (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004). Segundo os autores, eritrócitos, leucócitos e trombócitos compõem o perfil sanguíneo, e um indivíduo de 120g produz diariamente, o correspondente a  $10^{12}$  células sanguíneas.

O comparativo entre as várias espécies permite compreender a relação entre características sanguíneas, filogenia, atividade física, habitat e adaptabilidade dos peixes ao ambiente, o que determina o interesse ecológico associado ao fisiológico. As células que compõem a série leucocitária como linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos, são comumente detectadas na circulação sanguínea dos peixes (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004).

Segundo Pimpão (2006), a composição sanguínea de peixes está sujeita aos fatores fisiológicos e ecológicos e, além disso, estes estudos hematológicos são ainda poucos conclusivos quando se aborda as variações ambientais.

## 2.9 HISTOLOGIA

Em razão de importantes características como grande superfície de absorção, pequenas distâncias de difusão e ao grande fluxo contracorrente, as brânquias são consideradas órgão dominante na captação e absorção de substâncias dissolvidas na água, o que resulta em alterações fisiológicas do organismo (MONTEIRO et al., 2005; GARCIA-SANTOS; FONTAÍNHAS-FERNANDES; WILSON, 2006; ROMÃO et al., 2006; FERNANDES et al., 2007). No tecido branquial, a elevação epitelial da lamela secundária, se constitui em uma das primeiras alterações observadas em brânquias de peixes expostos a água contendo agentes tóxicos como óleos,

detergentes, amônia, ácidos, fenóis e metais como mercúrio, níquel, cádmio, zinco e cobre.

Segundo Svobodová et al., (2005), Garcia-Santos et al., (2007) e Ribeiro (2007) as brânquias são importantes também nas trocas gasosas, na regulação osmótica, no balanço ácido-base e no transporte e excreção de compostos nitrogenados. Essa multifuncionalidade faz das brânquias um órgão chave no monitoramento dos poluentes presentes no meio aquático. Nesse sentido, as alterações histológicas são reconhecidas como método rápido e válido na caracterização dos danos causados pela exposição dos peixes a diferentes poluentes (GARCIA-SANTOS et al., 2007; RIBEIRO, 2007).

Alterações histopatológicas provocadas por água contaminada são quantificadas pela morfometria, método utilizado na análise de espessura dos filamentos epiteliais, assim como na contagem do número de células de cloreto e de células mucosas (MONTEIRO et al., 2009).

A exposição de peixes a pesticidas organofosforados, resulta em alterações morfológicas de brânquias que têm sido relatadas por diversos autores. O estudo de *Lepomis macrochirus*, exposto a concentração aguda do Malation, levou a necrose, edema, descolamento do epitélio e fusão de lamelas secundárias, acrescidos de deslocamento de epitélio e destruição da integridade lamelar secundária, quando o estudo foi realizado com *Oreochromis niloticus* (RUDNICKI, 2004).

As alterações histológicas constituem excelentes biomarcadores de exposição a agentes químicos porque são compatíveis às respostas bioquímicas, principalmente às alterações nas cinéticas enzimáticas (RUDNICKI, 2004). Segundo Krüger (2001), o paradigma para o estabelecimento de condições de equilíbrio nos sistemas naturais deve incluir um constante monitoramento, que permite o desenvolvimento de ações corretivas e educacionais em população alvo. O uso de biomarcadores, capazes de indicar alterações nos fluidos corporais, células ou tecidos, resultantes



presença de contaminantes no ambiente justificou o desenvolvimento do presente trabalho.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Estabelecer os biomarcadores enzimáticos, hematológicos e histológicos em *Oreochromis niloticus* - Linnaeus, 1758 (Osteichthyes: Cichlidae), quando expostos ao Acefato, Difenconazol e Sulfluramida.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Investigar o comportamento de *Oreochromis niloticus* (tilápia-do-Nilo) nos meios contendo acefato, difenoconazol e sulfluramida;
- Determinar o efeito dos agrotóxicos sobre a integridade das células sanguíneas de defesa orgânica;
- Caracterizar as alterações histológicas em brânquias dos indivíduos submetidos ao acefato, difenoconazol e sulfluramida;
- Avaliar as alterações cinéticas das enzimas AChE, BChE, ALP, GST em cérebro, brânquias, plasma, músculo e intestino.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material

Acetilcolina iodado, butirilcolina iodado, ditiobis - 2 nitrobenzóico acid (DTNB), 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CNDB), p-nitrofenilfosfato (pNPP), glutationa reduzida (GSH), albumina sérica bovina (BSA), foram obtidos da Sigma-Aldrich®. Acefato (Orthene® 750 BR); difenoconazol (Score®) e sulfluramida (Atta mex-s®).

Cloreto de sódio, Carbonato de sódio anidro, Bicarbonato de sódio, Fosfato monoácido de potássio, Fosfato diácido de potássio foram adquiridos da MERK. As determinações espectrofotométricas foram realizadas em espectrofotômetro Beckman SP-22. Para manter constante a temperatura no tempo de reação foi utilizado aparelho de Banho-Maria QUIMIS. A homogeneização dos tecidos foi desenvolvida em aparelho homogeneizador Potter–Elvehjam, revestido com teflon.

Nas operações de monitoramento dos parâmetros físico-químicos da solução dos bioensaios, fez-se uso do aparelho Multiparâmetro (YSI 85 oxygen, conductivity, salinity e temperature). Os valores de pH de todas as soluções utilizadas nos ensaios foram realizadas em aparelho pHmetro eletrônico Quimis 400A. Todas as operações de centrifugação foram realizadas em centrífuga refrigerada Sigma, modelo 3K30, à temperatura de 4°C. Para preparo histológico os tecidos foram seccionados em aparelho micrótomo Leica RM 2125RT.

## 4.2 Aquisição e Aclimação do Animal

Peixes juvenis de água doce, *Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758 (Teleostei: Cichlidae), aparentemente saudáveis e sem lesões, foram obtidos da Piscicultura Barra do Mangaraí, (Lat. 20°08'22.38" S, Long. 40°26'32.03" O) em Santa Leopoldina, Estado do Espírito Santo, transferidos para o laboratório e aclimatados em tanque de 250L, contendo água decolorada, por um período de 05 dias. Durante o período de aclimação, a temperatura ambiente foi mantida em  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  com ciclo de fotoperíodo natural de 12h claro:12h escuro. O nível de  $\text{O}_2$  dissolvido foi mantido acima de 5mg/L por aeração contínua e a temperatura da água monitorada durante todo o processo. O pH foi mantido em  $7,2 \pm 0,2$ , como descrito por Tavares-Dias et al., (1999).

Os peixes foram alimentados diariamente *ad libitum*, com ração comercial seca granulada contendo 34% de proteína bruta, uma vez por dia, segundo recomendações Tavares-Dias et al., (2002), e monitorados quanto ao comportamento, alimentação e respiração para garantir peixes em boas condições para a etapa experimental.

## 4.3 Protocolo Experimental

Para a realização do teste, 30L água decolorada foram transferidos para 12 aquários de vidro (20 x 30 x 45 cm), separados em quatro tratamentos, com três repetições. O controle recebeu somente água decolorada. Os outros tratamentos receberam as soluções testes: acefato 1 mg/L (Orthene<sup>®</sup> 750 BR); difenoconazol 3,7 mg/L (Score<sup>®</sup>) e sulfluramida 0,3 g/L (Atta mex-s<sup>®</sup>).

Os peixes foram transferidos individualmente para os aquários e mantidos em solução durante as 96h do bioensaio, com aeração contínua e sem alimentação. As condições do bioensaio foram monitoradas e apresentaram: temperatura

22,41±0,11°C, saturação de oxigênio superior a 60% (64,09%), oxigênio dissolvido 5,60± 0,75 e pH de 6,22 a 7,30. O bioensaio foi semi-estático, no qual as soluções foram trocadas a cada 24h. Durante esse período os peixes foram monitorados quanto ao comportamento social, mortalidade e estabilidade na água.

Ao final de 96 h, os peixes foram transferidos para solução de 10 mg/L benzocaína, durante 15 min, para os procedimentos de pesagem, determinação do comprimento e obtenção do sangue e dos tecidos para estudos.

#### 4.4 Obtenção de Extratos Utilizados para Estudos Cinéticos da Acetilcolinesterase

Os tecidos de cérebro, brânquias e músculo foram retirados do animal anestesiado, lavados em solução salina (NaCl 0,9%) e congelados à temperatura de - 20°C até o processamento, que não ultrapassou 24 h. Cada tecido foi homogeneizado em três volumes de tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,2 (relação p/v) em banho de gelo. Após homogeneização, o material foi centrifugado a 15.000 x g durante 15 minutos. O sedimento foi desprezado e o sobrenadante considerado fonte de enzimas para os estudos cinéticos de AChE. O sangue total foi centrifugado e o plasma obtido foi utilizado para a determinação enzimática, segundo método descrito por Guilhermino et al., (1996).

#### 4.5 Obtenção de Extratos Utilizados para Estudos Cinéticos da Butirilcolinesterase

Os tecidos de cérebro, brânquias e plasma foram lavados em solução salina (NaCl 0,9%) e congelados à temperatura de - 20°C até o processamento, que não ultrapassou 24 h. O tecido foi homogeneizado em três volumes de tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,2 (relação p/v) em banho de gelo. Após homogeneização,

o material foi centrifugado a 15.000 x g durante 15 minutos. O sedimento foi desprezado e o sobrenadante considerado fonte de enzimas para os estudos cinéticos de BChE, segundo método descrito por Guilhermino et al., (1996).

#### 4.6 Obtenção de Extratos Utilizados para Estudos Cinéticos da Glutathione S-Transferase

Os tecidos de brânquias e fígado foram retirados do animal anestesiado, lavados em solução salina (NaCl 0,9%) e congelados à temperatura de - 20°C até o processamento, que não ultrapassou 24 h. Cada tecido foi homogeneizado em três volumes de tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 6,5, (relação p/v) em banho de gelo. Após homogeneização, o material foi centrifugado a 15.000 x g durante 15 minutos. O sedimento foi desprezado e o sobrenadante considerado fonte de enzimas para os estudos cinéticos de GST, adaptado de Prevodnik et al., 2007.

#### 4.7 Obtenção de Extratos Utilizados para Estudos Cinéticos da Fosfatase Alcalina

Para estudos cinéticos da ALP, a enzima foi extraída de intestinos dos peixes submetidos aos bioensaios, após anestesia, que foram lavados em solução salina (NaCl 0,9%) e congelados à temperatura de - 20°C até o processamento, que não ultrapassou 24 h. O tecido foi homogeneizado em três volumes de tampão carbonato/bicarbonato de sódio, 20 mM, pH 9,2 (relação p/v) em banho de gelo. Após homogeneização, o material foi centrifugado a 12.000 x g durante 15 minutos à 4°C. O sedimento foi desprezado e o sobrenadante considerado fonte de enzimas para os estudos cinéticos de ALP, adaptado de Rao, 2006.

#### 4.8 Preparações das Amostras e Procedimentos Hematológicos

De cada peixe foram coletados 0,5 mL do sangue total por punção da veia caudal com auxílio de seringas de 1 mL, previamente heparinizadas. Uma gota foi imediatamente utilizada na preparação de lâmina, utilizando a técnica de extensão. Após 24 h, as amostras foram fixadas em Metanol P. A., durante 15 minutos, seguida de lavagem com água destilada e coradas em solução 5% Giensa, durante 40 minutos (BÜCKER; CARVALHO; ALVES-GOMES, 2006)

As lâminas foram novamente lavadas com água destilada, secas em temperatura ambiente, como descrito por. As lâminas foram destinadas às contagens diferenciais de células sanguíneas de defesa orgânica (leucócitos), segundo a metodologia e nomenclatura sugerida por Tavares-Dias et al., (2002). Foram contadas 100 células em cada esfregaço, estabelecendo-se o percentual de cada componente celular usando o contador de células sanguíneas Kacil CCS-02. O restante do sangue foi centrifugado a 3.000 x g durante 10 minutos, em aparelho Bio ENG BE4000, para obtenção do plasma para análises enzimáticas.

#### 4.9 Preparações Histológicas

Para os procedimentos histológicos, o segundo arco branquial direito foi retirado e lavado em solução salina (NaCl 0,9%). Após fixação em solução de Bouim durante 24 h, as brânquias foram decalcificadas, desidratadas em álcool, clareadas com xilol e embebidas em parafina (MONTEIRO et al., 2009). Secções histológicas com 3 µm de espessura foram feitas com auxílio de micrótomo Leica RM 2125RT, seguidas de secagem à 37°C, durante 24h. As amostras foram coradas com solução de hematoxilina e eosina, segundo método descrito por Martoja e Martoja-Pierson (1970).

## 4.10 Métodos Analíticos

### 4.10.1 Acetilcolinesterase

A atividade da AChE foi determinada em cérebro, brânquias, músculo e plasma, segundo método descrito por Ellman et al., (1961) e modificado por Guilhermino et al., (1996). A atividade da AChE foi medida espectrofotometricamente em cubetas de 1 mL, contendo 100 mM de tampão fosfato de potássio pH 7,2; 0,4 mM de acetiltiocolina iodado e 0,27 mM 5,5', dithiobis - 2 nitrobenzóico acid (DTNB). A reação foi iniciada pela adição de 50 $\mu$ L do extrato enzimático e acompanhada pela formação do TNB a 412nm à 25°C. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade capaz de transformar 1 $\mu$ mol de substrato por minuto. A atividade foi expressa como  $\mu$ mol TNB/min mg proteína.

### 4.10.2 Butirilcolinesterase

A atividade da BChE foi determinada em cérebro, brânquias e plasma segundo método descrito por Ellman et al., (1961) e modificado por Guilhermino et al., (1996). A atividade da BChE foi medida espectrofotometricamente em cubetas de 1 mL, contendo 100 mM de tampão fosfato de potássio pH 7,2; 0,4 mM de butiriltiocolina iodado e 0,27 mM 5,5', dithiobis - 2 nitrobenzóico acid (DTNB). A reação foi iniciada pela adição de 50 $\mu$ L do extrato enzimático e acompanhada pela formação do TNB a 412nm à 25°C. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade capaz de transformar 1 $\mu$ mol de substrato por minuto. A atividade foi expressa como  $\mu$ mol TNB/min mg proteína.

### 4.10.3 Glutationa S-Transferase

A GST foi determinada segundo método descrito por Habig, Pabst e Jakoby, (1974) em fígado e brânquias de peixe. A atividade da GST foi medida espectrofotometricamente em cubetas de 1 mL, contendo 100 mM de tampão fosfato



de potássio pH 6,5; 20mM de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CNDB) e 40 mM de glutationa reduzida (GSH). A reação foi iniciada pela adição de 50 $\mu$ L do extrato enzimático e acompanhada, pela formação do produto, a 340nm à 25°C. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade capaz de transformar 1 $\mu$ mol de substrato por minuto. A atividade foi expressa como  $\mu$ mol GSH min<sup>-1</sup> mg protein<sup>-1</sup>.

#### **4.10.4 Fosfatase Alcalina**

A ALP foi determinada de acordo com Barred (1972), porém utilizando pNPP como substrato. A atividade da ALP foi determinada espectrofotometricamente em cubetas de 1 mL, contendo 20 mM de tampão bicarbonato de sódio pH 9,2; 2mM pNPP e 100 mM MgCL<sub>2</sub>. A reação foi iniciada pela adição de 50 $\mu$ L do extrato enzimático. Após 10 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 1M NaOH, seguida por centrifugação à 3.000 rpm durante 3 minutos. A atividade foi determinada baseada na formação de p-nitrofenol a 405 nm. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade capaz de transformar 1 $\mu$ mol de substrato por minuto. A atividade foi expressa como  $\mu$ mol GSH min<sup>-1</sup> mg protein<sup>-1</sup>.

#### **4.11 Determinação da Proteína**

A concentração protéica nos homogenatos foi determinada espectrofotometricamente, segundo metodologia padronizada por Lowry et al. (1951), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

#### **4.12 Análise Estatística**

Todos os dados foram submetidos ao teste de Duncan para comparar as variáveis entre o controle e os tratamentos, os quais foram validados, e quando necessário combinado com o teste de Tukey para múltipla comparação. Os dados

hematológicos foram analisados por teste *t* Student, considerando o número total de leucócitos no sangue, calculados pelo método indireto nas extensões sanguíneas. As comparações estatísticas foram estabelecidas entre o controle e os testes, e considerado probabilidades de  $p < 0,001$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,05$  como níveis de significância.

## 5 RESULTADOS

Avaliações ecotoxicológicas de substâncias químicas que possam interferir na biota aquática devem incluir um ensaio controle, que no presente trabalho foi água declorada. Esse controle é utilizado não somente para avaliar a saúde dos organismos, mas também para servir como comparativo das alterações hematológicas, histológicas e enzimáticas, que possam advir do contato dos organismos com as substâncias químicas selecionadas.

No início do projeto foram definidas as substâncias a serem utilizadas e que tinham relação direta com a agricultura local, onde essas substâncias químicas são largamente utilizadas como forma de prevenção ao ataque de organismos, responsáveis pela perda da lavoura ou redução na oferta para o mercado consumidor.

Através da avaliação “*in loco*”, os princípios ativos Acefato, Difenoconazol e Sulfluramida, foram adotados como referência para os testes ecotoxicológicos nas concentrações 1 mg/L, 3,7 mg/L e 0,3 g/L, respectivamente.

### 5.1 Parâmetros físicos e químicos da água

Durante as 96 h do bioensaio, a temperatura da água nos tratamentos controle, acefato 1 mg/L (A), difenoconazol 3,7 mg/L (D) e sulfluramida 0,3 g/L (S) não apresentaram variação significativa, e os valores foram mantidos entre 22,2 e 22,7°C. O pH, determinado ao longo do bioensaio, variou entre 7,30, no controle, até 5,3 nas soluções tratamento. O valor inicial de pH observado em cada aquário manteve-se constante durante todas as trocas, a cada 24h, até o final do bioensaio. Por outro lado, a concentração do oxigênio dissolvido apresentou valores entre 4,16 e 7,13 mg/L e a saturação de oxigênio da água foram superiores a 60% (64,09%) (Tabela 1).

Tabela 1: Parâmetros físicos e químicos da água. Temperatura (°C), oxigênio dissolvido (OD) e O<sub>2</sub> saturado nos tratamentos Controle, Acefato (1 mg/L), Difenconazol (3,7 mg/L) e Sulfluramida (0,3 g/L). Os valores tabelados representam à média  $\pm$ desvio-padrão.

Tratamentos	Parâmetros físicos e químicos			
	Temperatura (°C)	pH	OD mg L <sup>-1</sup>	O <sub>2</sub> saturado (%)
Controle	22,58 $\pm$ 0,07	7,2 $\pm$ 0,02	6,01 $\pm$ 0,65	68,73 $\pm$ 8,39
Acefato 1 mg/L	22,45 $\pm$ 0,07	5,6 $\pm$ 0,09	5,46 $\pm$ 0,35	61,25 $\pm$ 4,54
Difenoconazol 3,7 mg/L	22,35 $\pm$ 0,11	5,3 $\pm$ 0,12	5,31 $\pm$ 0,82	62,97 $\pm$ 9,92
Sulfluramida 0,3 g/L	22,35 $\pm$ 0,05	6,22 $\pm$ 0,10	5,74 $\pm$ 0,98	64,95 $\pm$ 12,26

## 5.2 Análise comportamental

Como descrito por El-Sayed, Saad e El-Baher (2007), sinais de intoxicação, resultante do contato dos indivíduos com os agrotóxicos, foram bem caracterizados pelo comportamento dos peixes durante o período experimental. Quando comparado ao controle, os indivíduos expostos ao acefato, apresentaram mudanças comportamentais como: apatia, perda de equilíbrio, movimento rápido opercular, natação errática e histérica, movimento circular e natação na superfície da água. Alguns indivíduos tornaram-se menos ativos ou totalmente inativos, permanecendo imóvel no fundo do aquário. Todas essas alterações comportamentais foram observadas nos três tratamentos, porém com intensidades diferentes. A concentração utilizada, durante as 96 horas, não induziu a qualquer mortandade.

### 5.3 Biometria

Com o objetivo de caracterizar a uniformidade em relação ao tamanho e peso dos indivíduos utilizados nos bioensaios, optou-se em realizar a biometria, que consistiu na determinação do comprimento caudal e do peso corporal. Como podem ver na Tabela 2, as médias do comprimento e do peso total, não diferiram significativamente nos três regimes de exposição e controle.

Tabela 2: Peso corporal (g) e comprimento caudal (cm) de *O. niloticus* expostos aos tratamentos durante 96 h. Os valores tabelados representam a média  $\pm$ desvio-padrão.

Tratamentos	n	Peso corporal (g)	Comprimento caudal (cm)
Controle	6	133,28 $\pm$ 13,01	20,27 $\pm$ 0,95
Acefato 1 mg/L	6	167,88 $\pm$ 24,41	21,46 $\pm$ 1,19
Difenoconazol 3,7 mg/L	6	153,98 $\pm$ 26,02	20,83 $\pm$ 0,93
Sulfluramida 0,3 g/L	6	128,98 $\pm$ 23,69	19,45 $\pm$ 1,45

## 5.4 Atividade Enzimática em *Oreochromis niloticus*

### 5.4.1 Acetilcolinesterase (AChE EC 3.1.1.7) em cérebro

O perfil de exposição para atividade da AChE no cérebro foi avaliada usando-se concentrações dos agrotóxicos, comparados com grupo controle. A atividade da acetilcolinesterase diminuiu significativamente no grupo tratado com acefato em relação ao grupo controle ( $p=0,004$ ), e não apresentou diferenças significativas nos demais grupos. Conforme demonstrado na Figura 7, quando comparados às atividades acefato x difenoconazol e acefato x sulfluramida, as diferenças foram significativas, assim como quando comparado difenoconazol e sulfluramida. Em relação às atividades enzimáticas dos outros tratamentos, os resultados obtidos foram 1,27  $\mu\text{mol TNB/min/mg}$  de proteína para acefato, 1,60  $\mu\text{mol TNB/min/mg}$  de proteína para difenoconazol e 1,61  $\mu\text{mol TNB/min/mg}$  de proteína para sulfluramida, respectivamente, quando comparada a 1,96  $\mu\text{mol TNB/min/mg}$  de proteína do grupo controle. O grau de inibição enzimática nos ensaios foi avaliado, e os efeitos tóxicos do acefato foi 35,37% maior, quando comparado aos outros tratamentos, responsáveis pela inibição de 18,37%, no caso do difenoconazol e 17,86% pela sulfluramida. A resposta do cérebro aos difenoconazol e sulfluramida apresentou padrões similares, o que caracteriza resposta não significativo ( $p \geq 0,05$ ).

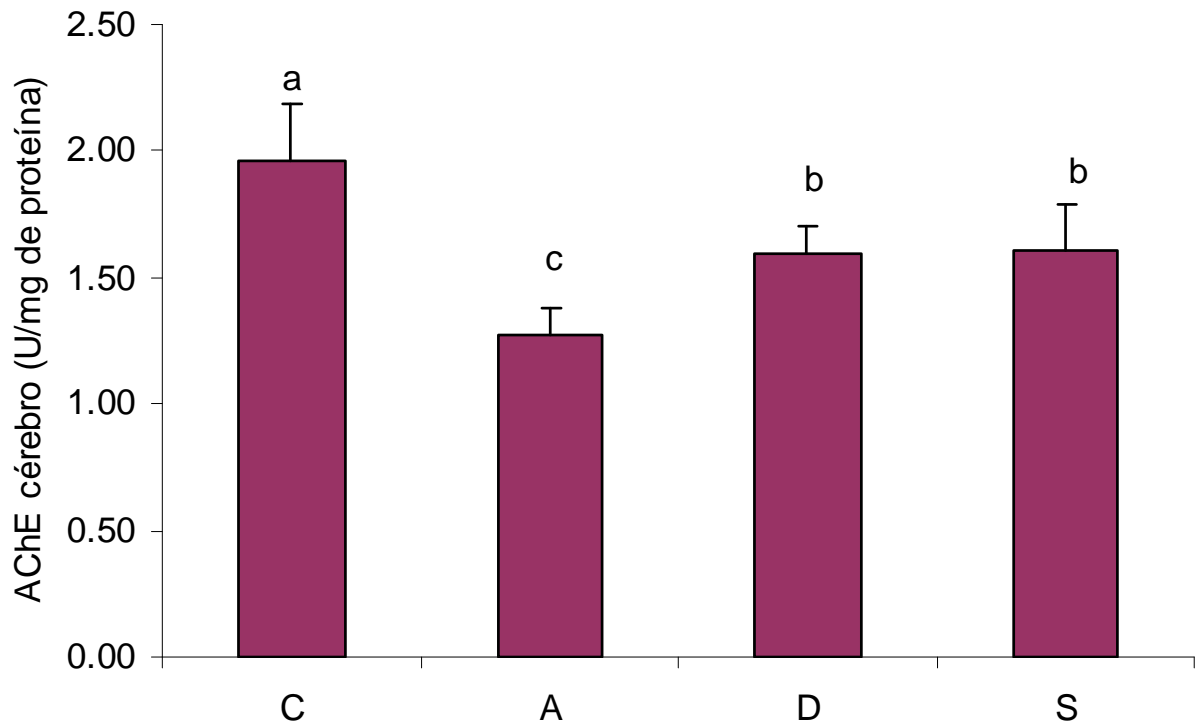


Figura 7: Atividade da Acetilcolinesterase em cérebro de *Oreochromis niloticus*, submetidos ao acefato (A); difenoconazol (D) e sulfluramida (S), durante 96 h. O controle (C) foi desenvolvido em água decolorada. A atividade enzimática foi expressa em U/mg de proteína. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de 1  $\mu\text{mol}$  de TNB formado por minuto por mg de proteína. Letras diferentes apresentam diferenças significativas pelo teste Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Os valores representam à média de seis indivíduos ( $n=6$ ), com 03 determinações enzimáticas por peixe.

#### 5.4.2 Acetilcolinesterase (AChE EC 3.1.1.7) em brânquias

De acordo com a Figura 8, pode ser observada uma redução na atividade acetilcolinesterásica nas brânquias, com valores significativos para o grupo tratado com acefato ( $p \leq 0,00024$ ), quando comparado ao grupo controle. Com relação ao difenoconazol, ressalta-se que a diferença, comparada ao controle, foi de ( $p=0,00021$ ), valor próximo ao organofosforado. Por outro lado, a comparação entre a sulfluramida e controle, resultou em valor ( $p=0,0006$ ), significando toxicidade menos intensa em relação ao acefato e controle e difenoconazol e controle.

Entretanto, quando comparados os tratamentos acefato x difenoconazol, acefato x sulfluramida e difenoconazol x sulfluramida, a única resposta significativa em relação à inibição da enzimática foi entre acefato e difenoconazol com valor  $p=0,0088$ . A atividade específica determinada nos indivíduos, foi de  $1,37 \mu\text{mol TNB}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína para os submetidos ao acefato,  $1,45 \mu\text{mol TNB}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína para difenoconazol e  $1,42 \mu\text{mol TNB}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína para sulfluramida, quando comparados ao controle ( $1,58 \mu\text{mol TNB}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína). O percentual de inibição da acetilcolinesterase nesse órgão foi significativamente maior no grupo exposto ao acefato (14,30%), seguido do sulfluramida (10,10%) e difenoconazol (8,02%), comparado com 0% de inibição do controle.

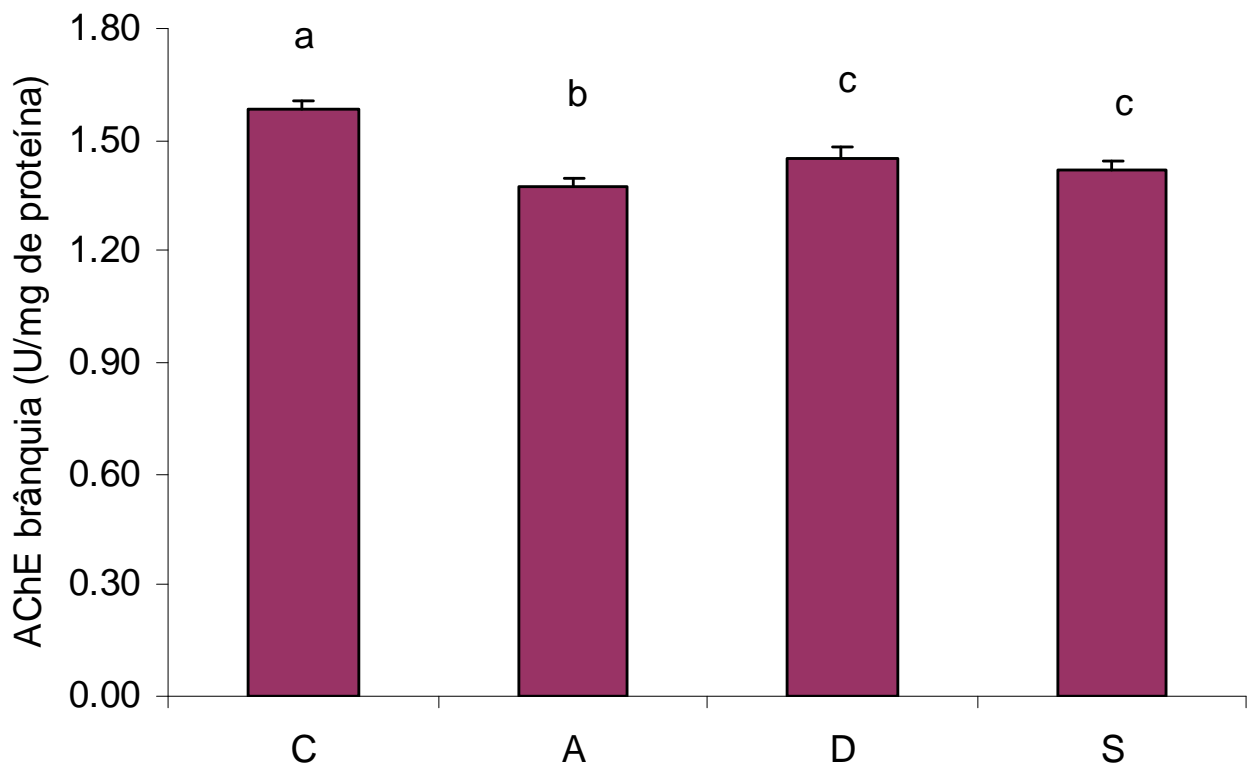


Figura 8: Atividade da Acetilcolinesterase em brânquias de *Oreochromis niloticus*, submetidas ao acefato (A); difenoconazol (D) e sulfluramida (S), durante 96 h. O controle (C) foi desenvolvido em água dechlorada. A atividade enzimática foi expressa em U/mg de proteína. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de  $1 \mu\text{mol}$  de TNB formado por minuto por mg de proteína. Letras diferentes apresentam diferenças significativas pelo teste Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Os valores representam a média de seis indivíduos ( $n=6$ ), com 03 determinações enzimáticas por peixe.



### 5.4.3 Acetilcolinesterase (AChE EC 3.1.1.7) em plasma

A atividade da acetilcolinesterase no plasma diminuiu significativamente no grupo tratado com acefato em relação ao grupo controle, e não apresentou diferenças significativas nos demais grupos. A resposta ao tratamento acefato, comparado ao controle, foi significativa com valor  $p=0,00395$ . Quando comparado os outros tratamentos com o controle, ou mesmo entre si, todos os valores foram não significativos com valores de  $p \geq 0,05$  (Figura 9).

Esses dados estão embasados nos valores obtidos das atividades enzimáticas, cujos valores foram de  $0,55 \mu\text{mol TNB}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína para o grupo submetido ao acefato, valor de  $0,65 \mu\text{mol TNB}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína para o grupo submetido ao difenoconazol e, finalmente, a atividade específica de  $0,67 \mu\text{mol TNB}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína, para o grupo submetido à sulfluramida. A inibição da acetilcolinesterase no plasma foi significativa no grupo exposto ao acefato e resultou em percentual de 25,10%, seguido pelo difenoconazol e sulfluramida, cujos valores percentuais representaram 11,70% e 9,87%, respectivamente, quando comparados ao ensaio controle.

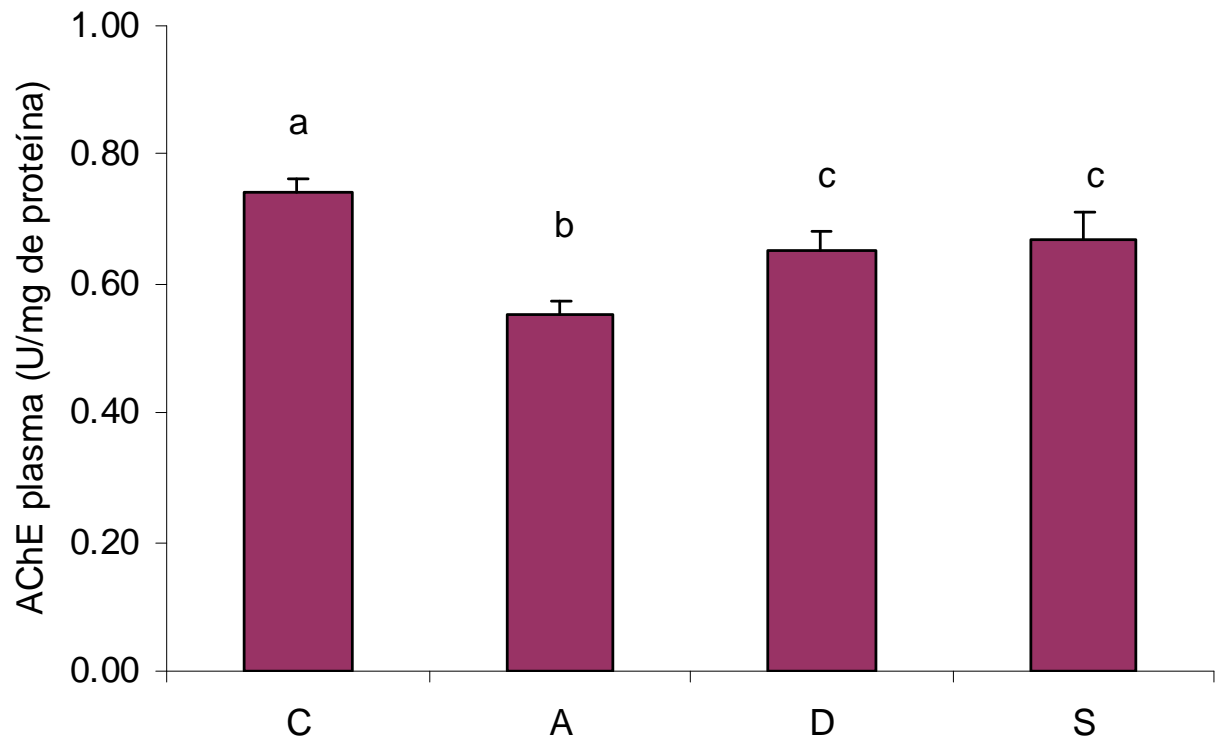


Figura 9: Atividade da Acetilcolinesterase em plasma de *Oreochromis niloticus*, submetidas ao acefato (A); difenoconazol (D) e sulfluramida (S), durante 96 h. O controle (C) foi desenvolvido em água decolorada. A atividade enzimática foi expressa em U/mg de proteína. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de 1  $\mu\text{mol}$  de TNB formado por minuto por mg de proteína. Letras diferentes apresentam diferenças significativas pelo teste Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Os valores representam à média de seis indivíduos ( $n=6$ ), com 03 determinações enzimáticas por peixe.

#### 5.4.4 Acetilcolinesterase (AChE EC 3.1.1.7) em músculo

Não houve diferença significativa na atividade da acetilcolinesterase entre os diferentes tratamentos (Figura 10). Os valores das atividades enzimáticas obtidos foram 0,85  $\mu\text{mol}$  TNB/min/mg de proteína para o ensaio com acefato, 0,97  $\mu\text{mol}$  TNB/min/mg de proteína para o tratamento com difenoconazol e 0,95  $\mu\text{mol}$  TNB/min/mg de proteína para sulfluramida, quando comparados com 0,99  $\mu\text{mol}$  TNB/min/mg de proteína do grupo controle (Figura 10). O perfil inibitório da enzima muscular foi mais representativo no grupo exposto ao acefato (14,10%), seguido do sulfluramida (4,03%) e finalmente com o difenoconazol (1,68%).

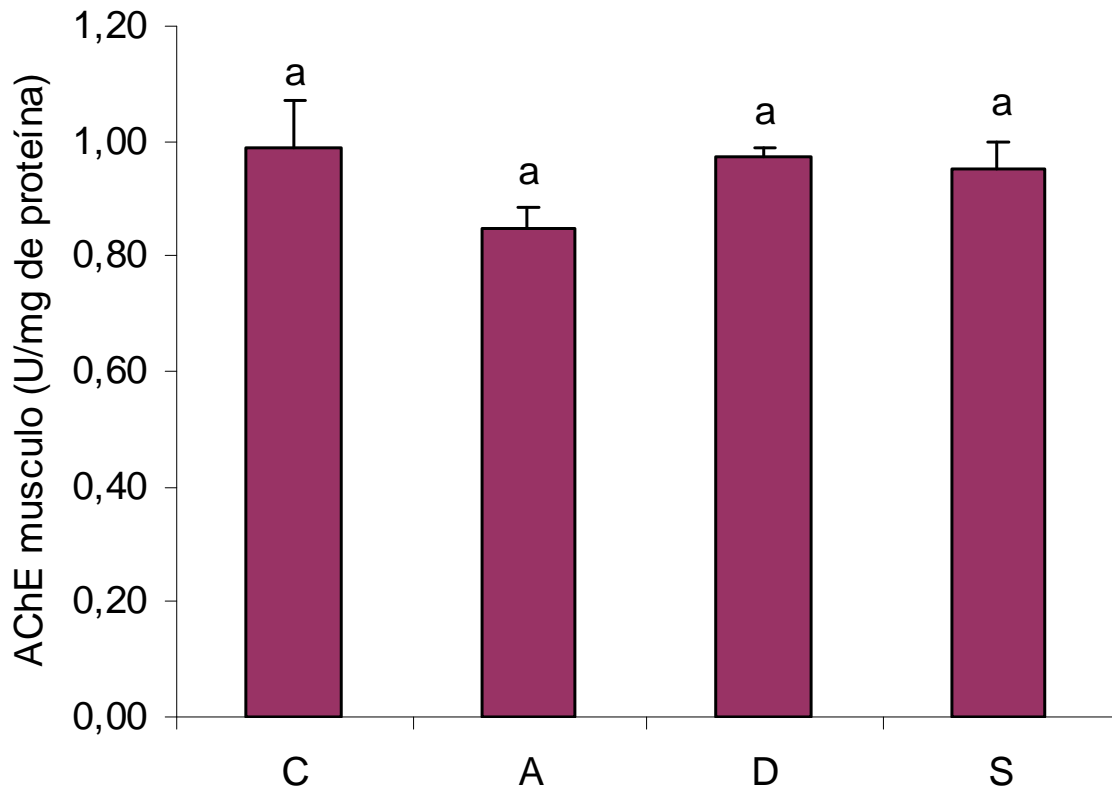


Figura 10: Atividade da Acetilcolinesterase de músculo de *Oreochromis niloticus*, submetidas ao acefato (A); difenoconazol (D) e sulfluramida (S), durante 96 h. O controle (C) foi desenvolvido em água declorada. A atividade enzimática foi expressa em U/mg de proteína. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade capaz de transformar 1  $\mu\text{mol}$  de substrato por minuto por mg de proteína. Letras diferentes apresentam diferenças significativas pelo teste Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Os valores representam a média de seis indivíduos ( $n=6$ ), com 03 determinações enzimáticas por peixe.

#### 5.4.5 Butirilcolinesterase (BChE EC 3.1.1.8) em cérebro

Os resultados desses experimentos, em termos de atividade específica para a butirilcolinesterase em cérebro, submetidos aos três tratamentos, mostraram-se mais sensíveis quando comparados aos obtidos com acetilcolinesterase, principalmente para sulfluramida, já que esta enzima não foi inibida com o terceiro tratamento (Figura 7). A atividade da BChE na amostra acefato, apresentou uma diferença significativa ( $p=0,000195$ ) quando comparada ao controle, assim como em relação ao difenoconazol ( $p=0,00533$ ), além do tratamento com sulfluramida ( $p=0,000204$ ).

Quando se considerou as atividades resultantes do tratamento com difenoconazol, os valores apontam para diferença significativa ( $p=0,00022$ ) em relação ao controle, e também para os dados comparados entre difenoconazol x sulfloramida ( $p=0,00019$ ) (Figura 11).

Os valores das atividades enzimáticas obtidos foram  $0,60 \mu\text{mol TNB}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína para o ensaio com acefato,  $0,67 \mu\text{mol TNB}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína para o tratamento com difenoconazol e  $0,46 \mu\text{mol TNB}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína para sulfloramida, quando comparados com  $0,80 \mu\text{mol TNB}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína do grupo controle (Figura 11).

Em termos percentuais de inibição, os resultados permitem caracterizar uma inibição de 25,56% ao tratamento com acefato, 16,82% para aquele submetido ao difenoconazol e, uma inibição considerável, de 42,55%, para a atividade enzimática quando submetida ao tratamento com sulfloramida.

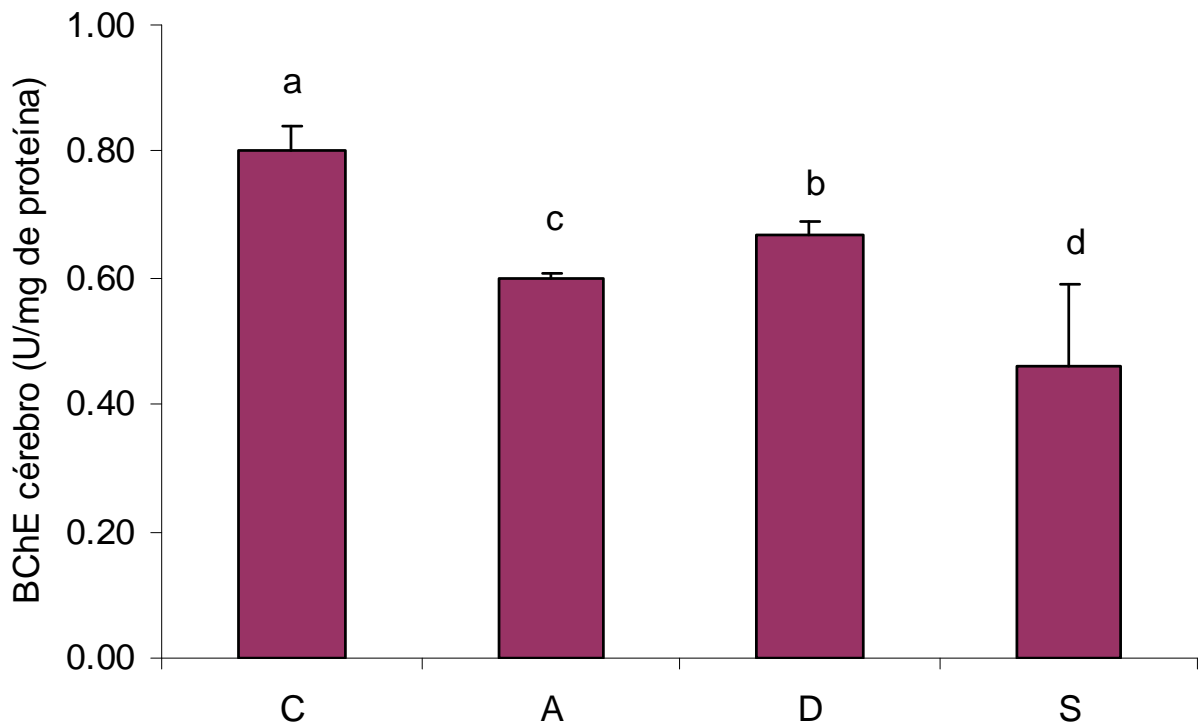


Figura 11: Atividade da Butirilcolinesterase em cérebro de *Oreochromis niloticus*, submetidas ao acefato (A); difenoconazol(D) e sulfluramida (S), durante 96 h. O controle (C) foi desenvolvido em água declorada. A atividade enzimática foi expressa em U/mg de proteína. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade capaz de transformar 1  $\mu$ mol de substrato por minuto por mg de proteína. Letras diferentes apresentam diferenças significativas pelo teste Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Os valores representam à média de seis indivíduos ( $n=6$ ), com 03 determinações enzimáticas por peixe.

#### 5.4.6 Butirilcolinesterase (BChE EC 3.1.1.8) em brânquias

Significante inibição da atividade butirilcolinesterásica foi constatada no bioensaio em presença de acefato quando comparado ao ensaio controle ( $p=0,0051$ ). A mesma relação foi observada quando comparados acefato x difenoconazol, que se mostrou significativa, com valor  $p= 0,0256$ . Entretanto, a enzima não foi sensível à presença de difenoconazol, e o resultado apontou uma igualdade estatística em relação ao controle ( $p \geq 0,05$ ). Resultados semelhantes foram observados entre difenoconazol x controle ( $p=0,611$ ), sulfluramida x controle ( $p=0,07$ ) e ainda entre acefato x sulfluramida ( $p=0,353$ ) e finalmente, entre difenoconazol x sulfluramida ( $p=0,37$ ), conforme Figura 12.

Quando as atividades específicas são comparadas, obtêm-se valores iguais a 0,49  $\mu\text{mol TNB/min/mg}$  de proteína para o ensaio com acefato, 0,78  $\mu\text{mol TNB/min/mg}$  de proteína para o tratamento com difenoconazol e 0,64  $\mu\text{mol TNB/min/mg}$  de proteína para sulfluramida, quando comparados com 0,95  $\mu\text{mol TNB/min/mg}$  de proteína do grupo controle.

Entretanto, quando as atividades são comparadas em termos inibitórios, observa-se percentual maior de inibição no ensaio com acefato (48,37%) quando relacionado ao controle. Os percentuais de inibição entre os tratamentos difenoconazol e sulfluramida ficaram em torno dos valores 16,22% e 32,97%, respectivamente.

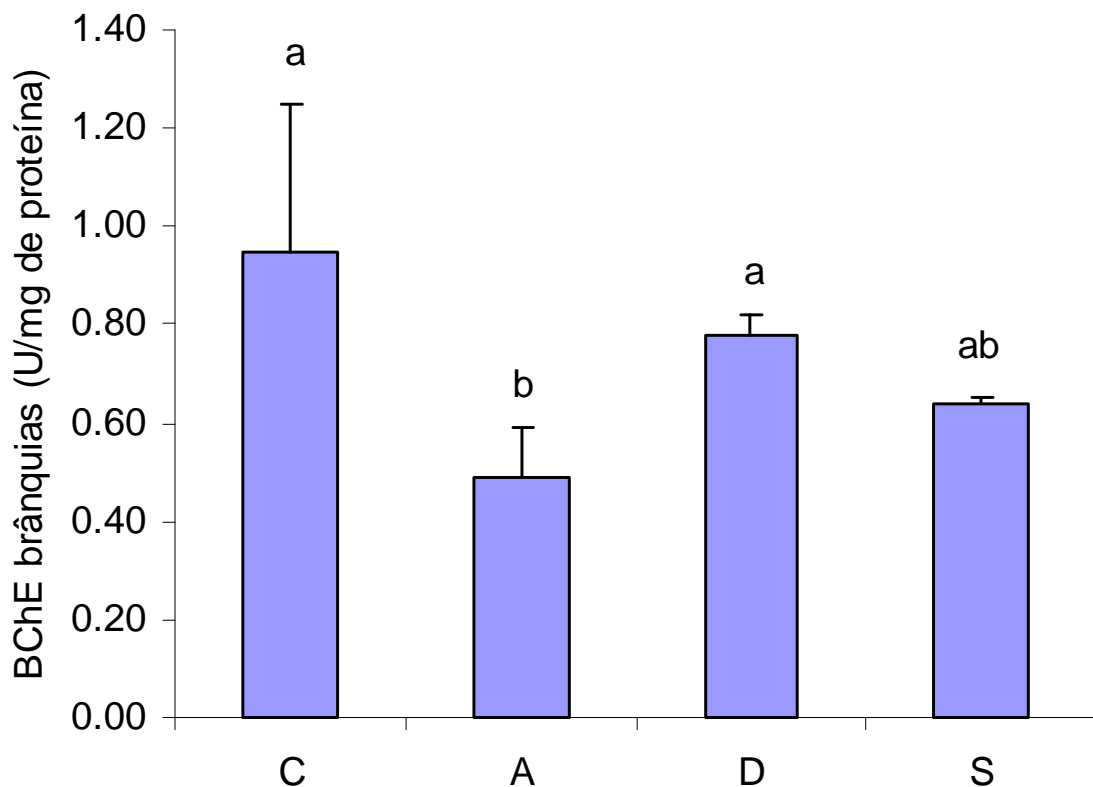


Figura 12: Atividade da Butirilcolinesterase em brânquias de *Oreochromis niloticus*, submetidas ao acefato (A); difenoconazol (D) e sulfluramida (S), durante 96 h. O controle (C) foi desenvolvido em água dechlorada. A atividade enzimática foi expressa em U/mg de proteína. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade capaz de transformar 1  $\mu\text{mol}$  de substrato por minuto por mg de proteína. Letras diferentes apresentam diferenças significativas pelo teste Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Os valores representam à média de seis indivíduos ( $n=6$ ), com 03 determinações enzimáticas por peixe.

#### 5.4.7 Butirilcolinesterase (BChE EC 3.1.1.8) em plasma

A atividade da BChE em plasma, em função de três diferentes tratamentos de agrotóxicos, pode ser constatado na Figura 13. A atividade específica mínima foi observada no tratamento com acefato quando comparado ao controle ( $p=0,0002$ ), enquanto que os valores obtidos, comparativamente, para difenoconazol e controle ( $p=0,0011$ ) e sulfluramida e controle ( $p=0,015$ ) foram estatisticamente significantes, porém com atividades mais elevadas. A resposta comparativa das atividades entre os tratamentos, permitiu confirmar valores significativos entre o acefato e difenoconazol ( $0,005$ ), e entre o acefato e a sulfluramida ( $0,0004$ ). A mesma relação permite confirmar ainda a similaridade entre o difenoconazol e a sulfluramida, que apresentaram valores estatísticos não significativos, com  $p=0,26$ .

Esses valores foram obtidos consideram-se as atividades específicas dos ensaios, nos quais a enzima respondeu com valor de  $0,20 \mu\text{mol TNB}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína para o acefato enquanto que os valores referidos para o difenoconazol e sulfluramida ficaram em  $0,28 \mu\text{mol TNB}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína e  $0,32 \mu\text{mol TNB}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína, respectivamente, quando comparados aos  $0,39 \mu\text{mol TNB}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína do controle.

Entretanto, quando se aborda os percentuais inibitórios da atividade específica, observam-se valores de  $14,3\%$  para o acefato,  $8,0\%$  para o difenoconazol e  $10,10\%$  para a sulfluramida, o que permite caracterizar resultados não significativos entre os dois últimos tratamentos.

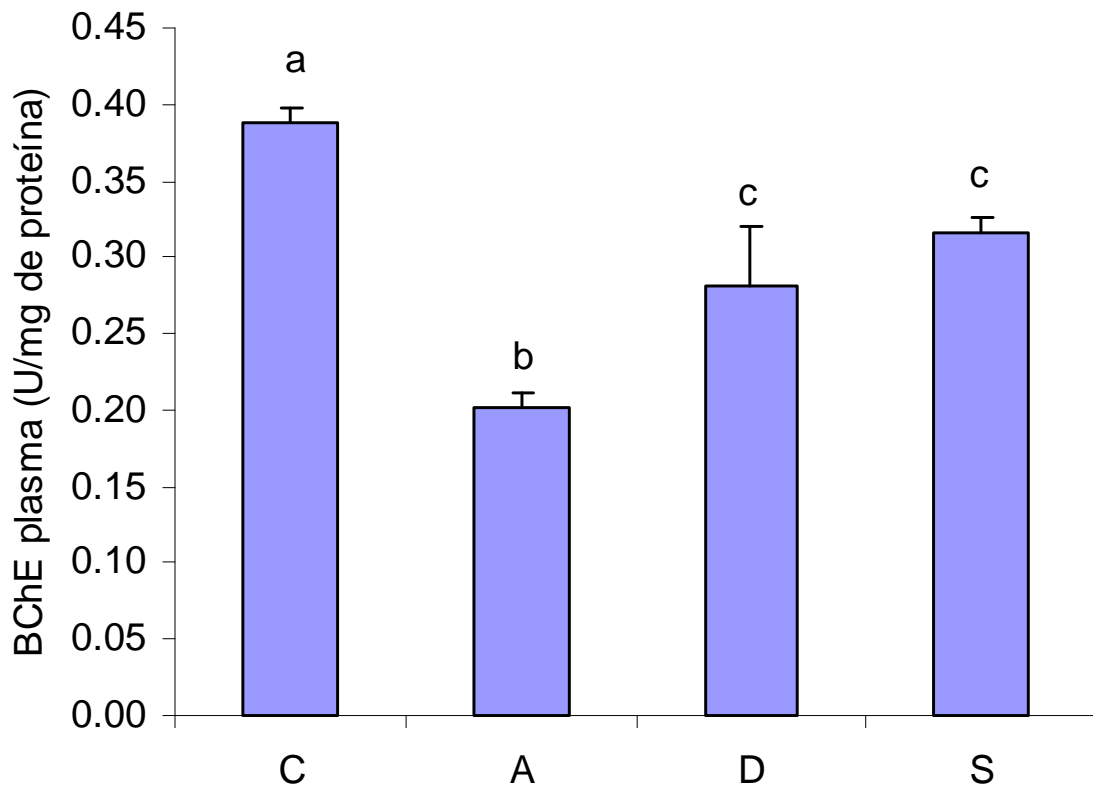


Figura 13: Atividade da Butirilcolinesterase em plasma de *Oreochromis niloticus*, submetidas ao acefato (A); difenoconazol (D) e sulfluramida (S), durante 96h. O controle (C) foi desenvolvido em água decolorada. A atividade enzimática foi expressa em U/mg de proteína. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade capaz de transformar 1  $\mu\text{mol}$  de substrato por minuto por mg de proteína. Letras diferentes apresentam diferenças significativas pelo teste Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Os valores representam à média de seis indivíduos ( $n=6$ ), com 03 determinações enzimáticas por peixe.

#### 5.4.8 Fosfatase Alcalina (ALP EC 3.1.3.1) em intestino

A fosfatase alcalina, obtida de indivíduos submetidos ao acefato, não apresentou diferenças significativas quando comparado ao controle ( $p \geq 0,05$ ). Através dessa linha de avaliação, é permitido afirmar ainda, a inexistência de diferenças significativas entre os tratamentos com difenoconazol e sulfluramida. No entanto, reduzida inibição foi constatada quando comparados entre si, os ensaios com difenoconazol e sulfluramida com aqueles do controle e acefato. Ao serem relacionadas às atividades específicas de cada ensaio, a atividade do grupo acefato foi  $0,45 \mu\text{mol p-nitrofenol/min/mg}$  de proteína, do difenoconazol  $0,31 \mu\text{mol p-nitrofenol/min/mg}$  de proteína e  $0,33 \mu\text{mol p-nitrofenol/min/mg}$  de proteína no grupo



com sulfluramida, quando comparado aos 0,46  $\mu\text{mol}$  p-nitrofenol/min/mg de proteína do controle (Figura 14).

A inibição enzimática da fosfatase alcalina no intestino foi maior naquele grupo exposto ao difenoconazol, com 32,60% de inibição, seguido do sulfluramida com 28,20%, quando comparados ao controle.

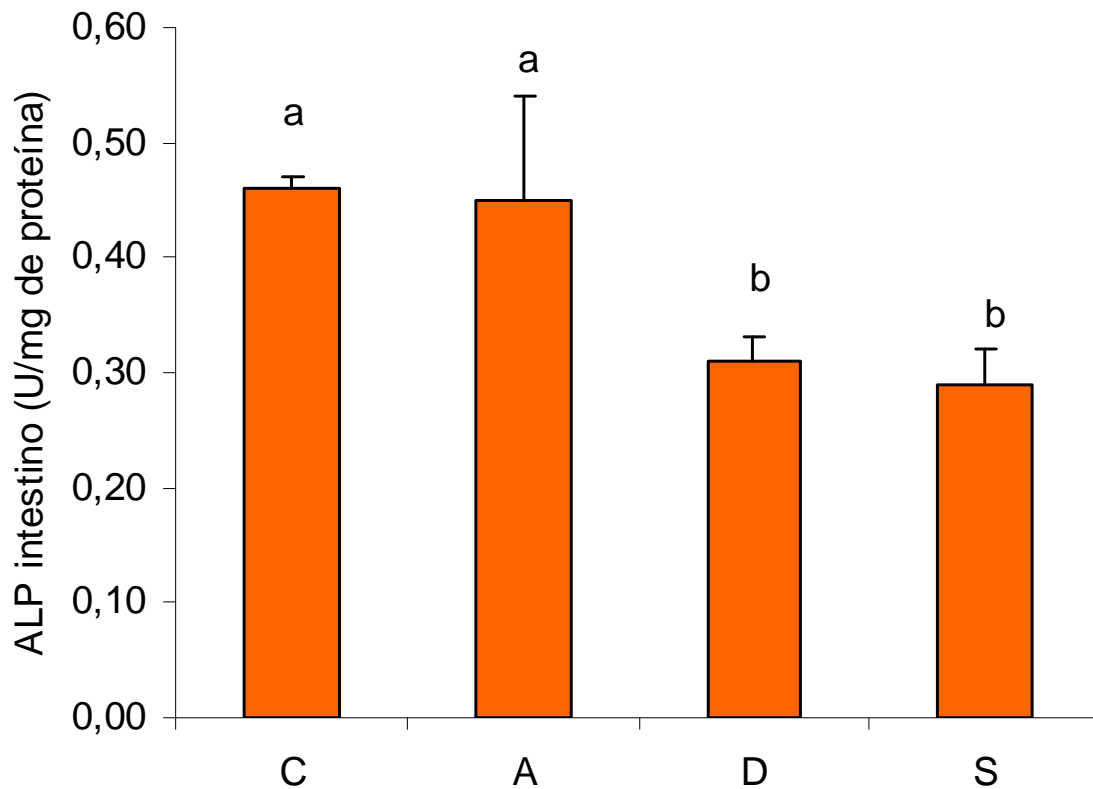


Figura 14: Atividade da Fosfatase Alcalina em intestino de *Oreochromis niloticus*, submetidas ao acefato (A); difenoconazol (D) e sulfluramida (S), durante 96h. O controle foi desenvolvido em água decolorada. A atividade enzimática foi expressa em U/mg de proteína. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade capaz de transformar 1  $\mu\text{mol}$  de substrato por minuto por mg de proteína. Letras diferentes apresentam diferenças significativas pelo teste Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Os valores representam à média de seis indivíduos ( $n=6$ ), com 04 determinações enzimáticas realizada por peixe.

#### 5.4.9 Glutathione S-transferase (GST EC 2.5.1.18) em fígado

O efeito dos agroquímicos sobre a GST hepática pode ser comprovado na Figura 15. Os valores resultantes dos tratamentos demonstram a função do fígado no processo de detoxificação, quando se constata a significância estatística de alguns tratamentos. O difenoconazol foi capaz de ativar a enzima de forma significativa ( $p=0,0002$ ) quando considerado o controle. Da mesma forma, o acefato e a sulfluramida resultaram em  $p= 0,0002$ . Entretanto, quando comparados difenoconazol x sulfluramida, observa-se o mesmo padrão de ativação, não existindo, porém, diferenças significativas entre esses ensaios ( $p=1,00$ ).

Ao serem considerados os valores das atividades específicas dos diversos ensaios, comparados ao controle, se obtém maior resultado para o difenoconazol ( $1,61 \mu\text{mol}$  de GSH conjugado/min/mg de proteína), seguido pelo ensaio realizado com sulfluramida ( $1,6 \mu\text{mol}$  de GSH conjugado/min/ mg de proteína) e, em terceiro lugar, para o acefato com valor  $1,23 \mu\text{mol}$  de GSH conjugado/min/mg de proteína, comparados ao valor de  $0,82 \mu\text{mol}$  de GSH conjugado/min/mg de proteína do controle.

Esses valores atestam à capacidade de resposta do tecido hepático ao elevar a atividade da GST em 97,1%, quando em contato com o difenoconazol, em 95,8% quando em presença de sulfluramida e finalmente, em 50,5% em presença do acefato. Tanto o difenoconazol como a sulfluramida tem poder de induzir, de forma similar, a resposta do organismo aos defensivos agrícolas. Em adição, deve-se considerar o valor de resposta da GST ao acefato que, comparado ao difenoconazol apresentou atividade reduzida, porém igualmente significativa quando comparada ao controle.

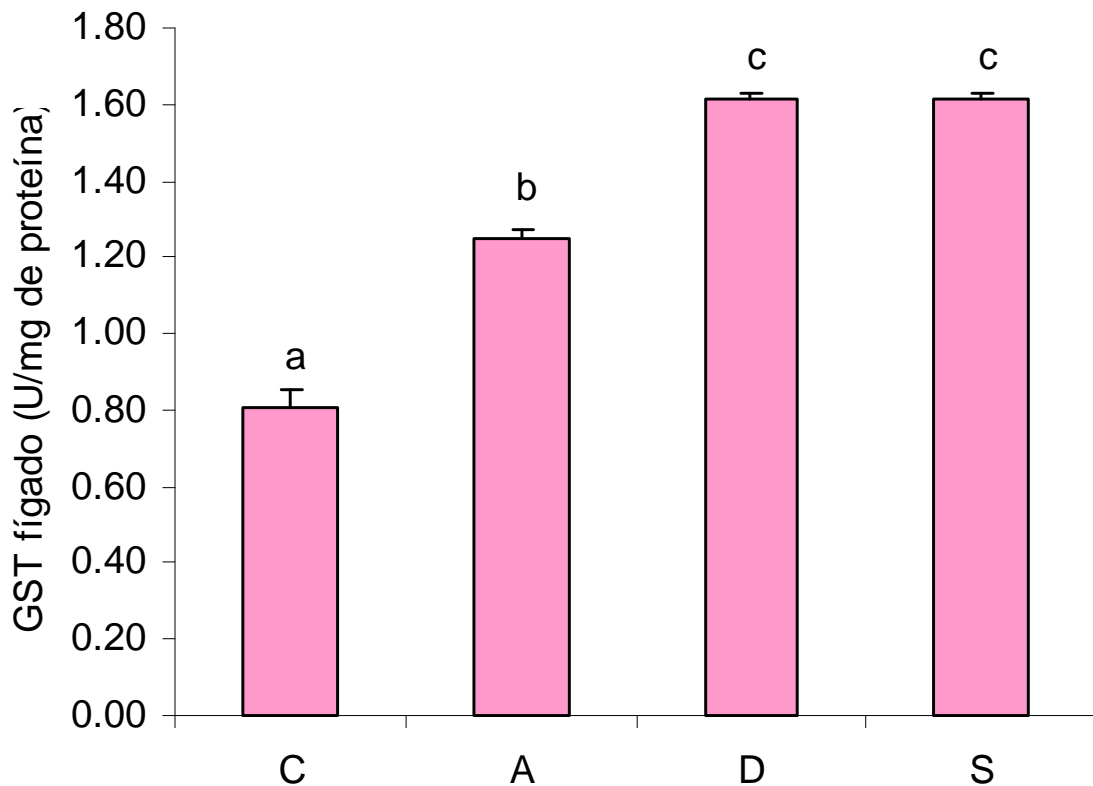


Figura 15: Atividade da Glutathione S-Transferase em fígado de *Oreochromis niloticus*, submetidas ao acefato (A); difenoconazol (D) e sulfluramida (S), durante 96h. O controle foi desenvolvido em água decolorada. A atividade enzimática foi expressa em U/mg de proteína. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade capaz de transformar 1  $\mu$ mol de substrato por minuto por mg de proteína. Letras diferentes apresentam diferenças significativas pelo teste Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Os valores representam à média de seis indivíduos ( $n=6$ ), com 03 determinações enzimáticas por peixe.

#### 5.4.10 Glutathione S-transferase (GST EC 2.5.1.18) em brânquias

A atividade da GST mostrou diferentes padrões de atividades em brânquias, principalmente quando considerado o tratamento com acefato, comparado aos ensaios com difenoconazol e sulfluramida. Como pode ser constatada na Figura 16, a resposta do acefato foi estatisticamente significativa em relação ao controle ( $p=0,005$ ). Entretanto, quando são comparados os resultados do difenoconazol ( $p=0,61$ ) e sulfluramida ( $p=0,07$ ) com o controle, observa-se igualdade nos resultados. Quando as comparações são realizadas entre os agroquímicos, a resposta é positiva para acefato x difenoconazol, cujo valor de significância foi

$p=0,025$ . Nenhuma significância, entretanto, foi observada entre os tratamentos do acefato x sulfluramida e difenoconazol e sulfluramida, cujos valores ficaram em  $p=0,35$  e  $p= 0,38$ , respectivamente.

A comparação entre as atividades específicas, permite comprovar o valor resultante do ensaio com acefato, de  $0,67 \mu\text{mol}$  de GSH conjugado/min/ mg de proteína, enquanto que o difenoconazol respondeu com valor de  $0,60 \mu\text{mol}$  de GSH conjugado/min/ mg de proteína e a sulfluramida, com valor de  $0,54 \mu\text{mol}$  de GSH conjugado/min/ mg de proteína, comparados ao controle ( $0,39 \mu\text{mol}$  de GSH conjugado/min/ mg de proteína).

A enzima respondeu de forma positiva aos ensaios com acefato, que resultou em  $71,7 \%$  de ativação em relação ao controle. Quando comparados os valores de atividades específicas, observa-se  $53,8\%$  de ativação para o difenoconazol e  $38\%$  para a sulfluramida.

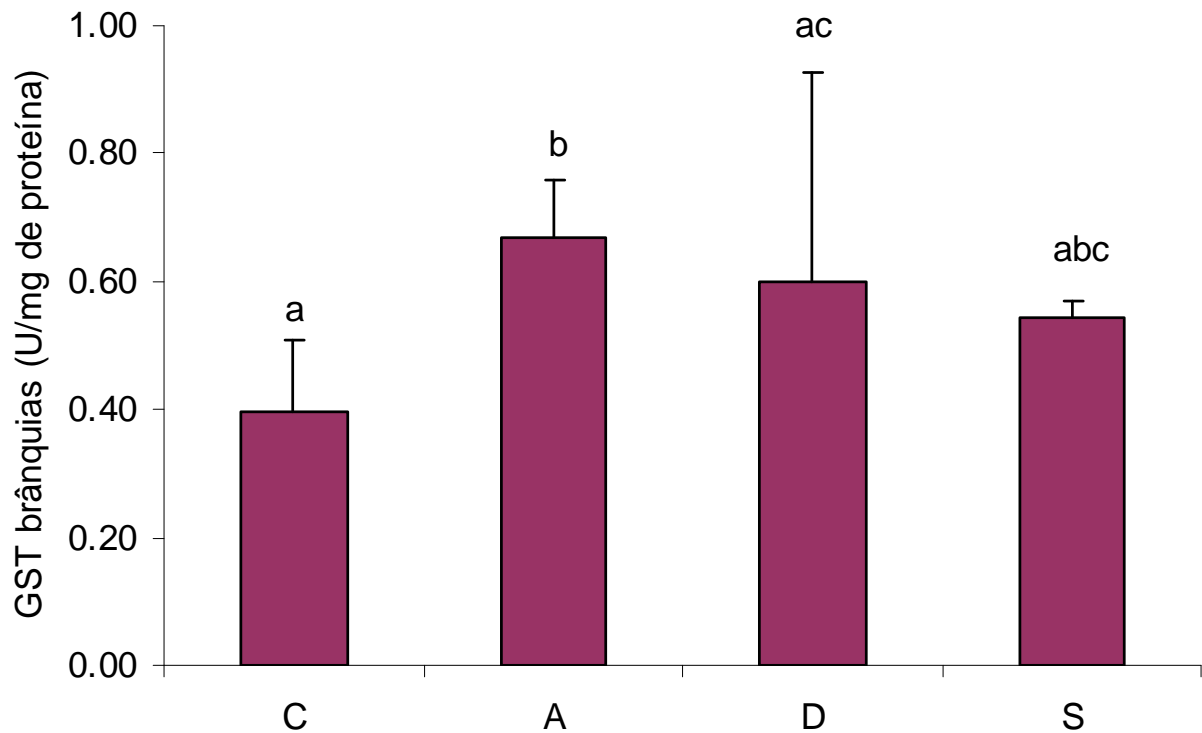


Figura 16: Atividade da Glutathione S-Transferase de brânquias de *Oreochromis niloticus*, submetidas ao acefato (A); difenoconazol (D) e sulfluramida (S), durante 96h. O controle foi desenvolvido em água dechlorada. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade capaz de transformar 1  $\mu$ mol de substrato por minuto por mg de proteína. Letras diferentes apresentam diferenças significativas pelo teste Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Os valores representam à média de seis indivíduos ( $n=6$ ), com 04 determinações enzimáticas por peixe.

### 5.5 Efeito dos Agrotóxicos sobre os Parâmetros Hematológicos do *Oreochromis niloticus*

Na contagem diferencial das células sanguíneas, de defesa do indivíduo, foram identificados e caracterizados os linfócitos, neutrófilos, monócitos, células granulocíticas especiais (CGE), eosinófilos e basófilos, o que possibilitou definir as diferenças percentuais entre os tratamentos (Figura 17). A comparação entre as células de defesa orgânica, linfócitos, monócitos e CGE, resultou em diferença não significativa ( $p \geq 0,05$ ) tanto nos grupos submetidos ao acefato, como naqueles submetidos ao difenoconazol e sulfluramida. Entretanto, significativas diferenças foram observadas entre o controle e o acefato para o perfil dos neutrófilos, ao contrário dos dados obtidos entre difenoconazol e sulfluramida (Figura 18).

Os basófilos, por sua vez, apresentaram diferença significativa quando comparados os valores dos grupos controle e dos submetidos ao acefato. A mesma comparação entre o controle e difenoconazol, controle e sulfluramida demonstraram similaridade entre os resultados (Figura 19).

A média de contagem de eosinófilos nos vários tratamentos, comparados ao controle, resultou em diferença não significativa, entre acefato e difenoconazol, e difenoconazol e sulfluramida, repetindo o já observado em relação aos monócitos. Por sua vez, os dados obtidos nas contagens das células granulocíticas especiais, resultou no mesmo comportamento daquele descrito para linfócitos e monócitos.

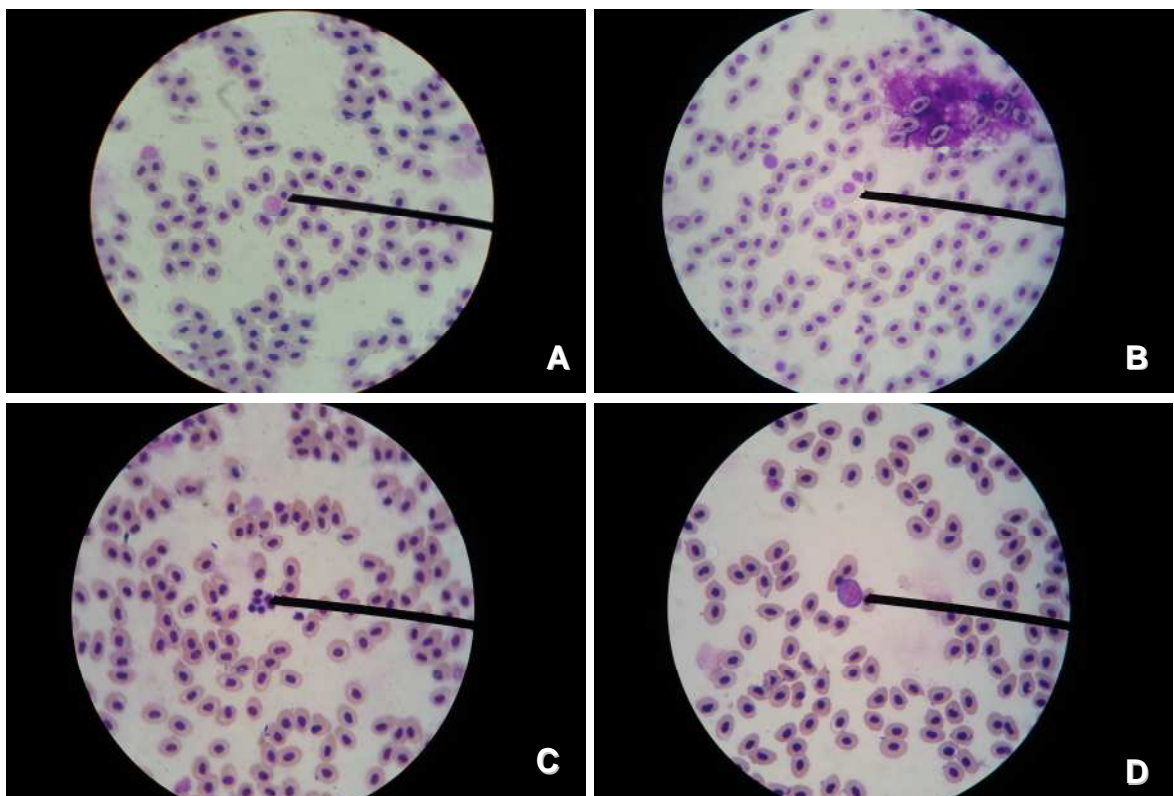


Figura 17: Células sanguíneas de defesa orgânica em *Oreochromis niloticus*. Na seqüência ilustrativa A: Linfócitos; B: Células Granulocíticas Especial (CGE) no tratamento controle; C: Trombócitos, tratamento com Sulfluramida; D: Linfócito, tratamento com Difenoconazol. Coloração HE. Objetiva 1,25.

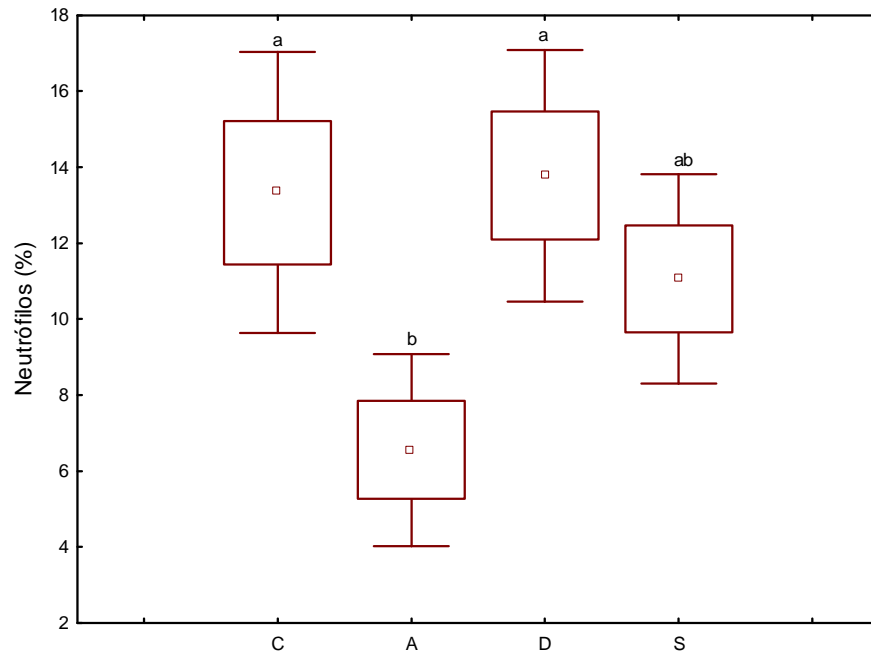


Figura 18: Alterações nos índices hematológicos de neutrófilos em *Oreochromis niloticus*, submetidas ao acefato (A); difenoconazol (D) e sulfuramida (S), durante 96h. O controle (C) foi desenvolvido em água dechlorada. Letras diferentes apresentam diferenças significativas pelo teste Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Os valores representam à média da contagem relativa de 100 células.

□ Média, □ Média  $\pm$  Erro Padrão, ⊥ Média  $\pm 1,96$ \*Erro Padrão.

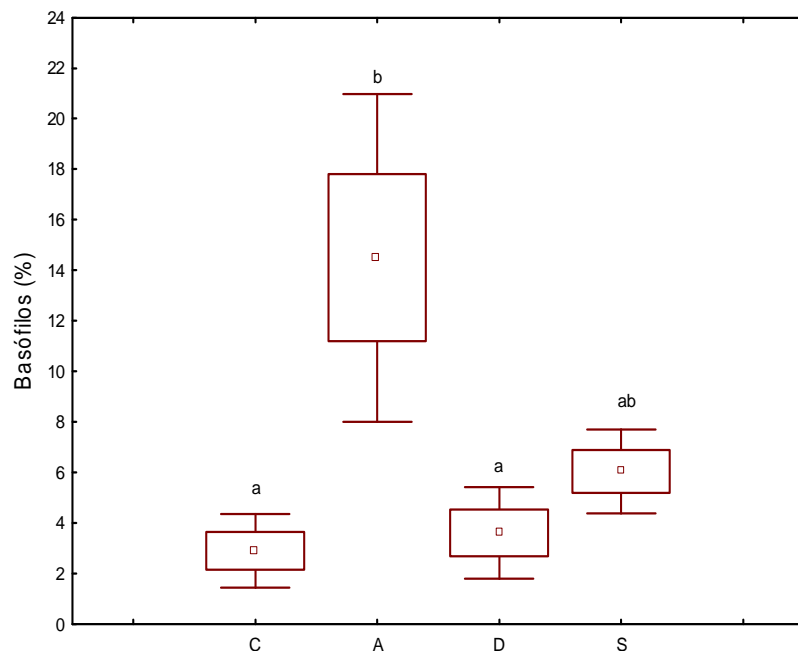


Figura 19: Alterações nos índices hematológicos de basófilos em *Oreochromis niloticus*, submetidas ao acefato (A); difenoconazol (D) e sulfuramida (S), durante 96h. O controle (C) foi desenvolvido em água dechlorada. Letras diferentes apresentam diferenças significativas pelo teste Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Os valores representam à média da contagem relativa de 100 células.

□ Média, □ Média  $\pm$  Erro Padrão, ⊥ Média  $\pm 1,96$ \*Erro Padrão.

## 5.6 Análise Histológica das Brânquias de *Oreochromis niloticus*

A morfologia branquial de *Oreochromis niloticus*, é similar às outras espécies de teleósteos (WILSON; LAURENT, 2002), e apresenta lamelas branquiais de onde saem, perpendicularmente, os filamentos primários, interligadas por um epitélio escamoso estratificado (tecido interfilamentar) constituído por diferentes tipos celulares como: células de cloreto, células mucosas e células planas. As brânquias nos indivíduos controle seguiram a morfologia padrão descrita para a espécie, o que demonstra uso de indivíduos saudáveis e sem registro de qualquer alteração morfológica (Figura 20).

Entretanto, as análises histológicas de brânquias dos indivíduos submetidos aos tratamentos com os agrotóxicos, permitiram visualizar áreas do epitélio branquial intactas em detrimento de outras, com importantes alterações como hiperplasia celular, seguida de preenchimento dos espaços interlamelares, além da elevada incidência de células excretoras de cloreto.

As alterações provocadas pelo acefato podem ser observadas na Figura 21, que expõe o número considerável de células cloreto com epitélio diferenciado na região basal. Nesta condição é observada elevada quantidade de hemossiderina, e a ausência de filamentos na lateral das brânquias o que caracteriza a zona de “apagamento” dos filamentos. Outras alterações importantes, resultantes da ação do acefato são: presença de edema na base do filamento e no espaço pericapilar, que no conjunto resulta na apoptose do filamento, enfartamento de capilares na porção distal dos filamentos com presença de báculos, filamentos atrofiados, presença de distrofias, vacuolização celular (hidrólise), colapso das veias, acentuando a presença de arteríola na porção média da lamela e na porção pré-capilar.

Quando analisado o tratamento com difenoconazol (Figura 22), é possível registrar alterações branquiais diferenciadas (qualitativamente), em relação ao controle e o acefato. As alterações mais representativas foram: alteração das células de cloreto,



aumento volumétrico das células mucosas, desestruturação e colapso lamelar, perda de filamentos e presença de báculos, seguido de zonas de enfartamentos.

Em adição, no tratamento com sulfluramida (Figura 23), é possível observar o “apagamento” filamentos, porém menos intenso daquele registrado para os tratamentos anteriores. Além disso, foi constatado ainda hipertrofia do epitélio interlamelar, perda de modelagem e muitas alterações profundas nas células de mucócitos, quando comparado ao difenoconazol. As alterações observadas, porém menos intensas, foram relacionadas ao desarranjo celular, desorganização dos filamentos, presença de báculos na porção distal dos filamentos e apoptose.

As alterações descritas para os três tratamentos, podem ser resumidas, considerando as principais células formadoras das lamelas branquiais, como pode ser constatado na tabela 3.

Tabela 3: Alterações histológicas observadas em *Oreochromis niloticus*, submetidas aos agrotóxicos.

Tratamentos	Cel. Excretora de sódio	Cel. Mucócitos	Cel. Planas de revestimento
Acefato 1 mg/L	+	++++	++
Difenoconazol 3,7 mg/L	++++	++	++
Sulfluramida 0,3 g/L	++++	+	+

Simbologia: Muito ++++ (>75%), Médio ++ (<75%), Pouco +(<50%)

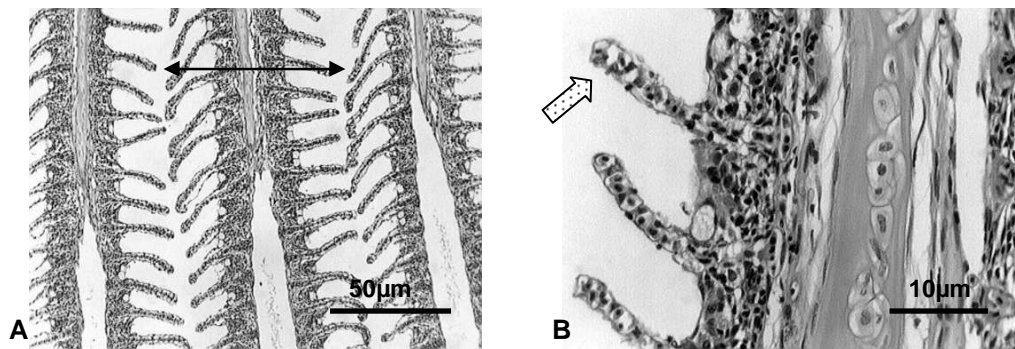


Figura 20: Lamelas branquiais do controle de *O. niloticus* após 96 horas de bioensaio. (A) boa conformação das lamelas e seus filamentos (  $\longleftrightarrow$  ). (B) Recorte que confirma a descrição do filamento (  $\dashrightarrow$  ) A 100x; b 400x , barra = dimensão.

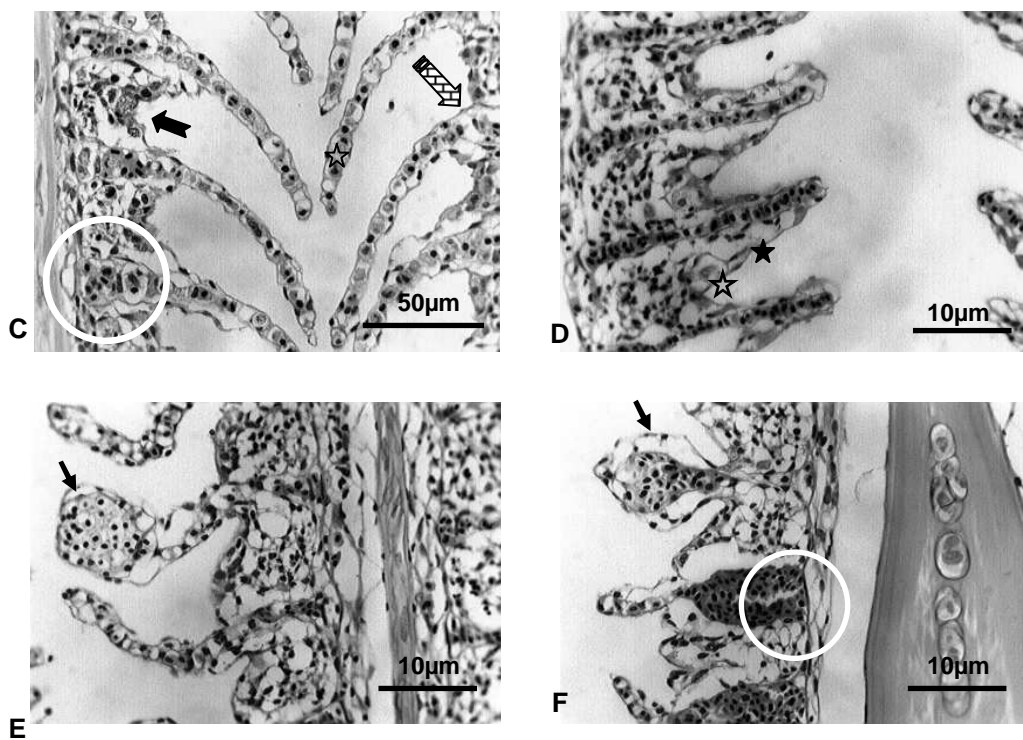


Figura 21: Lamelas branquiais de *O. niloticus* submetidas ao acefato, durante 96h de bioensaio. (C) Perda da vascularização (  $\dashrightarrow$  ), dilatação na iminência vascular (  $\circ$  ), formação de clusters de células de cloreto (  $\rightarrow$  ). (D) Formação de edema (  $\star$  ), sinais de hidrólise das células dos tecidos (  $\star$  ). (E) Formação de báculo (  $\rightarrow$  ). (F) Acentuação da dilatação da iminência vascular (  $\circ$  ), barra = dimensão.

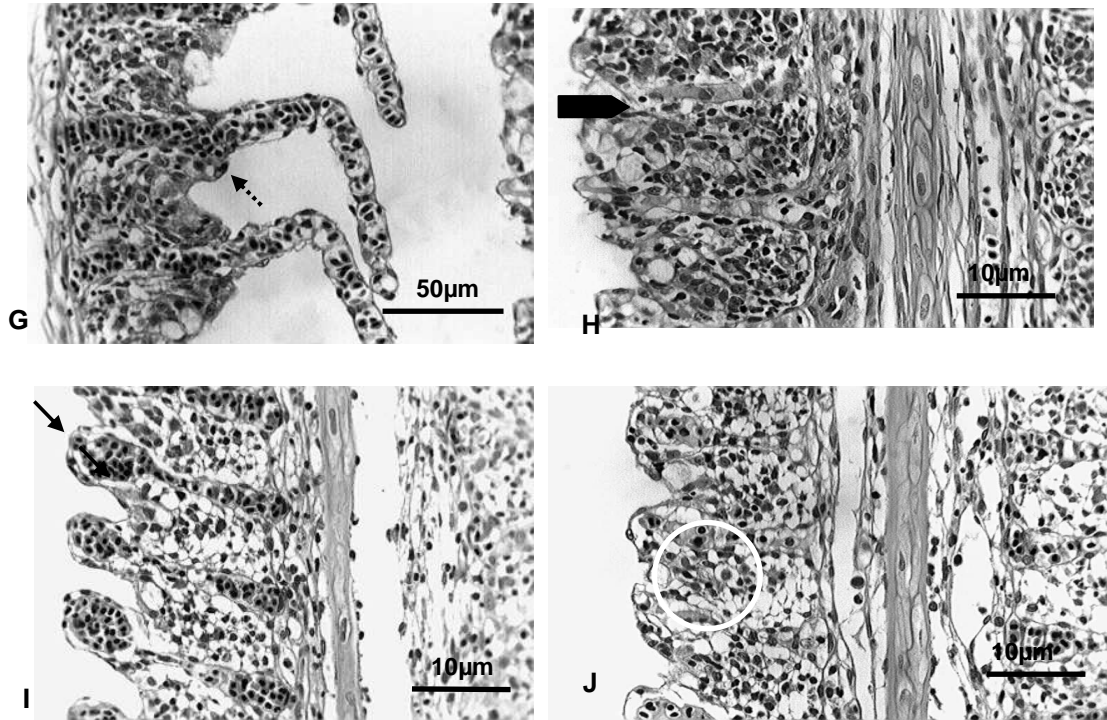


Figura 22: Lamelas branquiais de *O. niloticus* submetidas ao difenoconazol, durante 96h de bioensaio. (G) Enfartamento com perda de conformação dos filamentos (.....) (H) Aumento do epitélio interfilamentar com predominância de mucócitos (■) (I) Formação de báculos (→), (J) Apagamento vascular e displasia do filamento (○).

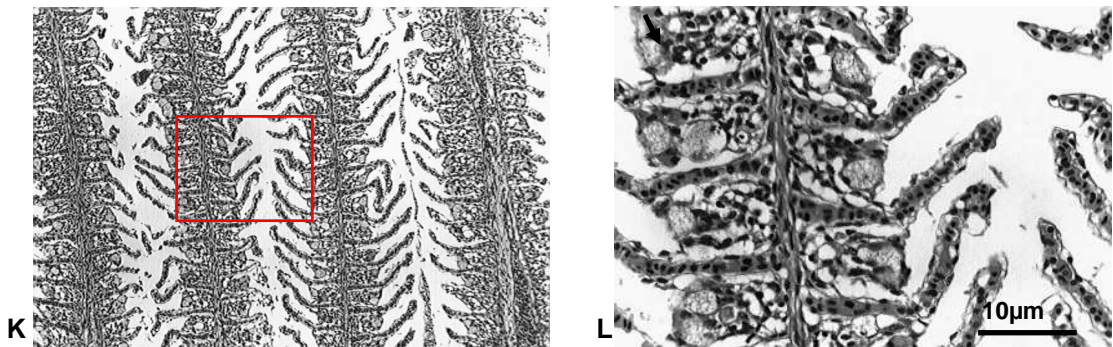


Figura 23: Lamelas branquiais de *O. niloticus* submetidas ao sulfluramida, durante 96h de bioensaio. (K) Desestruturação dos filamentos. (L) Ausência de células de cloreto, barra = dimensão.

## 6 DISCUSSÃO

A elevada resistência das pragas a vários agrotóxicos utilizados nas lavouras, muitas vezes de forma indiscriminada e fora dos padrões de concentração, constitui grande preocupação para a sociedade, pois a resistência eleva a demanda de uso de substâncias químicas perniciosas para o homem e o ambiente. Informações importantes quanto ao princípio ativo contido em uma formulação, assim como o grau de resistência dos insetos, por exemplo, são imprescindíveis na definição do inseticida a ser usado no combate a algumas pragas de lavouras (EGAAS, 2000).

As substâncias escolhidas para o desenvolvimento do presente trabalho estão em conformidade com as largamente utilizadas na agricultura do Estado do Espírito Santo e, o ponto de referência, a bacia hidrográfica do Rio Jucu, é tradicional no plantio de hortaliças que suprem a região Metropolitana da Grande Vitória.

Por sinal, as concentrações utilizadas rotineiramente pelos agricultores no combate às diversas pragas, serviram de referência para a montagem dos bioensaios no presente trabalho, que tentou se aproximar ao máximo da realidade do campo. Entretanto, se for considerada a frequência de utilização, é possível concluir o desenvolvimento de efeitos mais nocivos devido à prática da super-dosagem. Pesquisa a campo semelhante foi descrito por Petersen et al., (2007) ao estudarem o efeito do herbicida glifosato sobre o metabolismo de mudas de *Brassica napus* L.

Se observarmos os efeitos dessas substâncias sobre os organismos em determinado ambiente, é possível caracterizar a importância dos biomarcadores como ferramentas sensíveis e essenciais para a identificação de riscos de contaminação ambiental, como postulado por Egaas (2000) e Yadav et al., (2009).

## 6.1 Variações físicas e químicas durante o teste de toxicidade

A Resolução CONAMA nº 020, de 18 de junho de 1986, estabelece a qualidade da água para atender às necessidades das comunidades, o que inclui o abastecimento doméstico, proteção às comunidades aquáticas, à irrigação de hortaliças e plantas frutíferas e à criação natural/ou intensiva de espécies destinadas à alimentação, entre outras. Dentre os parâmetros estabelecidos estão o Oxigênio Dissolvido que não pode ser valor inferior a 6 mg/L de O<sub>2</sub>.

No controle, o O<sub>2</sub> dissolvido foi igual a  $6,01 \pm 0,65$  e se manteve estável durante todo o tempo experimental. Entretanto, nos tratamentos contendo acefato, difenoconazol e sulfluramida, foram constatados valores inferiores aos descritos para esta variável. O oxigênio dissolvido é essencial para a sobrevivência de peixes e outras vidas aquáticas além de auxiliar na decomposição natural da matéria orgânica (MICROMAL, acesso em 15 jul. 2009). Amostras dos agrotóxicos que contêm em sua formulação, outros componentes, podem ter potenciado a redução do O<sub>2</sub> dissolvido. Esse efeito é relatado para diversas substâncias presentes no ambiente, que promovem o consumo do oxigênio, o que pode ser comparado com o resultado obtido no controle.

Entretanto, foi verificado que a redução do oxigênio dissolvido não induziu qualquer modificação na atividade da lactato desidrogenase muscular, que apresentou alterações enzimáticas não significativas em todos os três tratamentos (dado não mostrado).

Deve ser salientado que no presente estudo, o pH do controle foi mantido em  $7,2 \pm 0,02$ , em todas as leituras realizadas ao longo do experimento. Esse valor está de acordo com os estabelecidos pelo CONAMA (pH 6,0 a 9,0), para águas de Classe II, como descrito acima. Entretanto, nas leituras realizadas nos ensaios em presença dos agrotóxicos, observou-se uma diminuição do pH, nos ensaios com

acefato e difenoconazol cujos valores foram  $5,6\pm 0,09$  e  $5,3\pm 0,12$ , respectivamente. Resultados semelhantes foram observados por Gassen (2009) quando peixes foram tratados com agrotóxicos paration, malation, trizóis e sulfluramida. O autor relatou ainda a capacidade dos peixes em viverem em faixa variável de pH.

Durante os bioensaios, optou-se pelo método semi-estático, com trocas das soluções a cada 24h, o que previne o acúmulo de produtos metabólicos, principalmente a amônia não ionizada, que é reduzida também pelo valor de pH ácido (GREENSTEIM et al., 1994). Ressalta-se ainda que, se comparado ao controle, cujo valor de pH foi mantido dentro da normalidade, a redução do pH nos meios experimentais, provavelmente, está relacionada à estrutura química dos componentes da formulação comercial do composto, capaz de interferir na concentração hidrogeniônica do meio.

Por outro lado, a manutenção da temperatura nos bioensaios foi essencial no presente trabalho, considerando sua influência no retardo ou aceleração da atividade biológica, crescimento e reprodução do peixe, na absorção do oxigênio, na precipitação de compostos, entre outros (MICROMAL, acesso em 15 jul. 2009). Dessa forma, é possível descartar qualquer interferência fisiológica nos resultados obtidos, resultante de alterações de temperatura, a qual poderia funcionar em sinergismos com outras variáveis (YADAV et al., 2009).

## 6.2 Estudo comportamental

O conhecimento da sensibilidade de *Oreochromis niloticus* aos vários agrotóxicos é essencial para a avaliação dos resultados dos testes de toxicidade, desenvolvidos, no presente estudo, com acefato, difenoconazol e sulfluramida, uma vez que o efeito tóxico observado pode estar relacionado à concentração das substâncias que são diretamente tóxicas para o organismo teste.

Deve ser salientado que no presente estudo, o comportamento dos indivíduos aos agrotóxicos, foi semelhante aos descritos para outros organofosforados, apesar de nenhum relato ter sido feito sobre o acefato. As alterações comportamentais foram mais intensas com o organofosforado, como já relatados para outras substâncias do mesmo grupo químico. Tomando como exemplo o difenoconazol, foi possível estabelecer parâmetros comportamentais semelhantes ao primeiro, porém em menor intensidade, o que nos permite supor uma ação semelhante ao acefato nos sistemas acima descritos. Esse resultado pode também ser estabelecido para o grupo químico sulfluramida.

El-Sayed, Saad e El-Baher (2007), conduziram um estudo com objetivo de verificar a influência dos organofosforados em *Oreochromis niloticus* monosex utilizados como bioindicadores. Para tanto, investigaram a influência do acefato e as manifestações anormais dos sistemas nervoso e respiratório. Como resultado observou a mesma característica relatada para outros bioindicadores, uma vez que o organofosforado inibe a acetilcolinesterase causando uma hiperestimulação dos receptores de acetilcolina, o que impede o processo normal da contração muscular. Além disso, a ação do pesticida interfere também em outros sinais comportamentais, o que levaram outros pesquisadores (JESUS; CARVALHO, 2008), a considerar a acetilcolinesterase como biomarcador de exposição.

Outros pesquisadores obtiveram respostas semelhantes ao fazerem uso de organofosforados como malation, em estudos sobre o desempenho de lagarto terrestre e arbóreo (HOLEM; HOPKINS; TALENT 2007), ou em estudos com o inseticida RPR-II em *Oreochromis mossambicus* (RAO, 2006), ou ainda em tilápia monosex com o pesticida deltametrina (El-Sayed; Saad; El-Bahr 2007). Todos os resultados relacionaram alterações comportamentais padrões para inibição da acetilcolinesterase. Entretanto, é importante destacar o resultado adverso constatado por Rezg et al., (2007), ao submeter camundongos ao malation.

### 6.3 Biometrias dos indivíduos

Na avaliação geral da biometria, ficou estabelecida a uniformidade entre os indivíduos escolhidos para a fase experimental. Quando substâncias químicas estão disponíveis em um ambiente, podem ser absorvidas por organismos e interferir na histologia, hematologia e no perfil bioquímico de muitas enzimas. Quanto mais jovem o organismo, maior o efeito dessas substâncias, em dada concentração, o que pode resultar em elevada mortalidade. A opção em trabalhar com indivíduos adultos permitiu maior segurança em relação aos resultados obtidos. Dessa forma, o efeito adverso observado poderia ter sido intensificado pela redução do tamanho corporal, com elevação da sensibilidade, o que poderia resultar na morte dos indivíduos.

### 6.4 Alterações enzimáticas

Vários parâmetros bioquímicos têm sido quantificados em organismos expostos a substâncias químicas, como objeto de investigação de mudanças induzidas pelos agentes toxicantes, nos processos envolvendo neurotransmissão, nas condições metabólicas, nos processos detoxificação e defesas antioxidantes. Peakall (1992) sugeriu essa abordagem ao reconhecer a utilidade dos parâmetros bioquímicos como um método popular de utilização, como marcadores específicos de contaminação. Entre os marcadores utilizados estão a acetilcolinesterase, butirilcolinesterase, fosfatase alcalina e glutathione S-transferase.

Deve ser salientado que no presente estudo, os efeitos adversos foram mais intensos nos tratamentos com o acefato, demonstrando maior sensibilidade ao organofosforado. Na avaliação do percentual de inibição, as amostras apresentaram resultados decrescentes quando relacionados acefato, difenoconazol e sulfluramida.



A redução da atividade de 35,37% para o acefato foi menor quando comparada aos resultados obtidos por Céron et al., (1996), o que permite supor que a formulação utilizada apresenta-se menos tóxica para o cérebro quando comparado com outros organofosforados.

Pelos resultados apresentados, pode-se destacar a ação da acetilcolinesterase, de cérebro de peixe, em obedecer a uma série de padrões cinéticos típicos, e consequentemente, desempenharem importante papel na transmissão dos impulsos nervosos. Considerações importantes devem ser feitas às alterações fisiológicas observadas em outras espécies, submetidas ao molinato (SANCHO et al., 2000) e diuron (BRETAUD et al., 2000), com distúrbios de movimento, letargia e alterações nos deslocamentos natatórios.

Quando analisadas as amostras branquiais, a ação do organofosforado foi menos intensa quando comparada ao cérebro e, a única exceção observada foi o percentual de inibição da sulfluramida que resultou em valor muito próximo daquela observada com o difenoconazol. Devem-se ressaltar, entretanto, os percentuais de inibição quando comparado os tratamentos entre si, nos vários órgãos.

No cérebro, tanto o difenoconazol como a sulfluramida apresentaram resultados semelhantes de inibição. Essa tendência foi observada também na resposta da enzima plasmática para o acefato, com redução da atividade enzimática em 25,10%, inclusive, bem inferior ao relatado para *Anguilla anguilla*, com percentuais inibitórios de 90% quando submetidos ao diazinon (CERÓN et al., 1996).

Essas análises mostraram-se consistentes e se assemelharam às disponíveis na literatura quando relatam diferenças significativas nas atividades de AChE em algumas espécies de peixes e órgãos (ALPUCHE-GUAL; GOLD-BOUCHOT, 2008).

A determinação da atividade colinesterásica em peixes tem sido usada como biomarcador nos processos de biomonitoramento da poluição aquática (YADAV et

al., 2009). A acetilcolinesterase é responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina, nas fendas sinápticas, durante a transmissão do impulso nervoso nas sinapses colinérgicas (THOMPSON, 1999). Esta enzima está localizada em uma proteína transmembrana nas diferentes membranas celulares de vertebrados e invertebrados, e controla o fluxo de correntes iônicas (LI, 2008) em sinapses e junções neuromusculares (YADAV et al., 2009).

A inibição da AChE por qualquer composto xenobióticos tem sido relatada como uma ferramenta para o diagnóstico de toxicidade de alguns pesticidas, como a organofosforados e carbamatos (KIM, 1999; ALPUCHE-GUAL; GOLD-BOUCHOT, 2008; LI, 2008; ZHANG et al., 2008; YADAV et al., 2009).

Céron et al., (1996) conduziram um estudo com *Anguilla anguilla* com objetivo de verificar a toxicidade do diazinon sobre a acetilcolinesterase em diversos tecidos. Como resultado observou inibição superior a 75% para a enzima de cérebro, apesar do extrato obtido de olhos ter apresentado ainda maior percentual inibitório.

Payne, Mathieu e Fancey (1996), mostraram uma inibição bem característica no tecido muscular de truta (*Salmo trutta*), obtidas de dois rios urbanos, que recebiam elevados aporte de efluentes industriais. O grau de inibição da acetilcolinesterase muscular foi inferior aos obtidos de outros tecidos. Ao analisar os resultados da atividade colinesterásica muscular, no presente trabalho, foi possível fazer uma correlação com os dados obtidos por Payne, Mathieu e Fancey (1996), em relação ao reduzido nível de inibição dos tratamentos comparados ao controle.

Os valores não mostraram significância estatística quando comparados com o controle. De posse destes resultados, é possível predizer a razão da baixa inibição obtida. Primeiro, a enzima apresentou atividade no tecido muscular, como constatado pelas amostras; segundo, as concentrações utilizadas nos bioensaios foram inferiores ao que poderia resultar em inibição significativa e, finalmente, o

tempo padrão de 96 horas, estabelecido para os bioensaios, não foi suficiente para o desenvolvimento de inibição significativa.

Essa suposição está embasada no fato da enzima ter respondido à ação dos agrotóxicos, porém em percentuais não representativos, bem diferentes de ensaios sem qualquer atividade enzimática. Esses resultados estão de acordo com as considerações de Perkins e Schlenk (2000), Rendón-von Osten et al., (2005), que apregoam a capacidade de pesticidas, em baixa concentração, de inibir a colinesterase de cérebro, porém incapazes de inibir a atividade no músculo, o que indica ainda valores maiores de EC50 para a enzima muscular comparadas com as cerebrais.

Este resultado corrobora com estudo realizado por Gluszczak (2008), que resultou em inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) em cérebros de piavas e jundiás, após exposição a diferentes concentrações do herbicida glifosato. Entretanto, no tecido muscular das espécies expostas, não ocorreram alterações significativas quando comparadas ao controle. Essa inibição da atividade da AChE pode estar relacionada com o aumento das catecolaminas, que conduz a uma condição de hiperglicemia. Além disso, a inibição da acetilcolinesterase pode estar relacionada com o grau de inervação do tecido cerebral, uma vez que quanto maior a inervação mais elevada à suscetibilidade de inibição.

Entretanto, existem evidências conflitantes relacionadas à capacidade de resposta dos diferentes tecidos para inibição da AChE nos animais aquáticos. Embora a maioria dos estudos tenha centrado atenção à relação entre inibição da AChE cerebral e sua toxicidade aguda, Li (2008) salientaram que a inibição superior da AChE muscular em peixes é importante resultado no sentido de comparar com os obtidos de cérebro, demonstrando o seu potencial de letalidade.

Outro fato importante a ser considerado, refere-se às concentrações dos organofosforados, triazóis e sulfonamida fluoroalifática, utilizados no presente experimento, que se aproximou ao máximo, daquele utilizado na lavoura e que muitas vezes é lixiviado para o rio, sem levar em conta, entretanto, a possibilidade de aplicações sucessivas dos produtos químicos pelos agricultores. Outro fator importante é a constatação das enzimas nos vários tecidos e que podem sofrer variadas influências de substâncias químicas.

Os resultados demonstram maior potencial de inibição no cérebro e no plasma, em resposta ao organofosforado e triazóis, seguido pelas brânquias e músculos, este último com valores mais reduzidos. Entretanto, quando comparados aos tratamentos com sulfonamida fluoroalifática, o grau de inibição foi maior no cérebro e brânquias, seguidos pelo plasma e músculos.

A capacidade de resposta dos diferentes tecidos à inibição da AChE, pode envolver vários fatores tais como a absorção, metabolismo, eliminação, fisiologia, sexo, e os tipos de inibidores colinesterásicos, que podem ser estruturas químicas específicas (LI, 2008).

As pesquisas que abordam aspectos de toxicidade dos inseticidas e fungicidas, em peixes, ainda são insipiente o que torna os resultados, obtidos no presente trabalho, passíveis apenas de serem comparados com outros desenvolvidos em ensaios laboratoriais. Em condições naturais, os vários fatores ambientais podem potencializar ou reduzir a ação dos princípios ativos ou, ao contrário, interferir na biodisponibilidade dos agroquímicos. Comparações entre organofosforados, relacionados ao tempo de permanência no ambiente, têm evidenciado maior resistência do acefato em águas superficiais, maior mobilidade no solo, e contaminação de lençóis freáticos. O organofosforado apresenta meia-vida de até 20 dias, tempo superior, por exemplo, ao metamidofós (YEN; LINK; WANG, 2000).

A utilização de diferentes substratos nos ensaios enzimáticos permitiu caracterizar atividades para acetil e butirilcolinesterase além do comportamento das enzimas em meios contendo inibidores colinesterásicos. Os valores de atividade nos controles demonstraram a supremacia da acetilcolinesterase sobre a butirilcolinesterase. Entretanto, os tecidos estudados, ao apresentarem atividade residual, foram importantes na caracterização do grau de inibição não somente entre os tecidos pesquisados, mas também na distinção do grau de inibição dos diferentes agentes.

Comparando as duas enzimas, o ensaio controle apresentou redução de 40% na atividade determinada em presença da butirilticolina, para o tecido cerebral, o que demonstra ser a acetilcolinesterase, a esterase predominante neste órgão. Nas amostras submetidas ao acefato, a resposta foi uma inibição de 25,56%. Na avaliação geral dos resultados, no presente estudo, foi constatado que a resposta inibitória da butirilcolinesterase pela sulfluramida foi maior quando comparada com a acetilcolinesterase. O menor resultado foi observado em presença de difenoconazol.

Da mesma forma, nos ensaios conduzidos com extrato de brânquias, também foi demonstrado resposta de toxicidade com o acefato, difenoconazol e sulfluramida. O surpreendente foi a resposta inibitória obtida nos extratos do acefato, valor superior àquele do cérebro, e que se equipara à inibição do cérebro em presença de sulfluramida.

Tu et al., (2009), descreveram estudos desenvolvidos com esterases em músculo e brânquias de camarão, em presença de acetilticolina, butirilticolina e propionilticolina. Os autores constataram atividade para os três substratos em ambos os tecidos, porém a resposta para butirilticolina foi 60% maior daquela para acetilticolina. Em presença de antibióticos e pesticidas, o potencial de inibição foi superior para a atividade acetilcolinesterásica.

Por outro lado, Sturm, Assis e Hansen (1999) descreveram a presença de atividades butiril e acetilcolinesterase em músculos de três espécies de peixes teleósteos marinhos: *Limanda limanda*, *Platichthys flesus* e *Serranus cabrilla*. A inibição

desencadeada pelo paraoxon, quando comparadas acetil e butirilcolinesterase, resultou em valor superior a três ordens de magnitude que aqueles de  $K_i$  para acetilcolinesterase no músculo. Os autores consideraram a presença de uma acetilcolinesterase típica no tecido e, em contrapartida, a presença de uma enzima atípica com atividade butirilcolinesterásica nos peixes estudados.

Os resultados de atividades butirilcolinesterásicas, divulgados no meio científico ainda são reduzidos, com exceção de alguns autores, como El-Sayed, Saad e El-Bahr (2007), que relataram elevada sensibilidade da enzima ao paration em extratos obtidos de músculo e fígado de *Gasterosteus aculeatus*.

A presença de duas colinesterases nos mesmos tecidos, como cérebro, brânquias e plasma, que apresentam diferentes sensibilidades ao acefato, difenoconazol e sulfluramida, são enzimas importantes a serem utilizadas no monitoramento ambiental, como potentes biomarcadores de contaminantes de ação neurotóxica, apesar do polimorfismo observado dentro de cada espécie de indivíduos.

A fosfatase alcalina é enzima que desempenha importante e crítico papel nos processos biológicos. É considerada enzima participante do processo de detoxificação, metabolismo e biossíntese de macromoléculas energéticas, destinadas a diferentes e essenciais funções na célula. Qualquer interferência na atividade dessa enzima, o resultado é o desequilíbrio metabólico, lesões nos tecidos e disfunção celular (RAO, 2006). A ALP é basicamente uma enzima ligada à membrana e qualquer alteração provocada pelos pesticidas altera a sua atividade enzimática.

Com relação ao presente estudo, as análises da atividade fosfatásica em intestino de *O. niloticus*, no grupo de peixes ensaiados em água declorada, mostraram um resultado considerável, o que possibilita supor o papel desempenhado no órgão, como o transporte de aminoácidos, defosforilação de compostos orgânicos entre outros. Entretanto, a resposta ao ensaio com acefato, não apresentou diferenças

significativas em relação ao controle, indicativo da não sensibilidade enzimática para o produto químico. Nas concentrações dos difenoconazol e sulfluramida, utilizadas no presente trabalho, observou-se que as atividades variaram após as 96 horas do bioensaio. Nestas concentrações, os agroquímicos foram moderadamente tóxicos para a tilápia, principalmente em relação ao tecido entérico. No entanto, resultados descritos por Atli e Canli (2007), demonstram elevação na atividade fosfatásica intestinal, em resposta aos ensaios desenvolvidos com metais, no qual os autores creditam a resposta enzimática às mudanças na estrutura intestinal, órgão importante na absorção de nutrientes.

No estudo desenvolvido em presença de difenoconazol, a enzima apresentou inibição de 32,6% em relação ao controle, que sinaliza dano tecidual e perturbações no sistema de transporte. Quando comparados acefato e difenoconazol, observam-se diferenças de 31% no padrão de inibição. Esses resultados sugerem maior mobilização de lisossomas e necrose celular (RAO, 2006).

O fígado é considerado o órgão mais importante envolvido na regulação do metabolismo oxidativo, onde enzimas consideradas chaves no processo são sintetizadas e responsáveis pela defesa contra a geração de Espécies Reativas do Oxigênio (MORENO et al., 2005).

Como reportado por Kappus (1986) e Di Giulio et al., (1989), as defesas antioxidantes que ocorrem nas células, são classificadas em três classes que incluem substâncias redutoras solúveis em água, como a glutatona, vitaminas lipossolúveis, como a vitamina E e, principalmente, as enzimas classificadas como pertencendo a Fase I e Fase II das defesas antioxidantes, e nesta última está incluída a Glutathione S-Transferase. Uma importante característica dessas enzimas é a capacidade de resposta aos agentes impactantes na forma de adaptação ao stress induzido por poluentes. Essa resposta está relacionada à capacidade de indução, que resulta em elevada atividade específica, determinada nos vários órgãos onde ocorrem naturalmente.

O comportamento do indivíduo às concentrações dos três poluentes permitiu caracterizar a resposta da GST hepática. Em contato com o acefato, a resposta antioxidante no fígado mostrou-se elevada quando comparada com o controle. A indução enzimática foi responsável pelo aumento em 50,5% da atividade. Entretanto, foi possível caracterizar a capacidade de resposta do indivíduo quando exposto ao difenoconazol, cujo aumento foi bastante significativo, com atividade quase dobrada quando relacionado ao controle (97,1%) e ainda da sulfluramida, com 95,8% de ativação. Observa-se que tanto o difenoconazol e a sulfluramida foram capazes de induzir, da mesma forma, a atividade enzimática.

A GST está envolvida na detoxificação de vários xenobióticos e a enzima desempenha papel importante na proteção tecidual contra o stress oxidativo. Deve ser considerado que o acúmulo de poluentes orgânicos é determinado pelo balanço dinâmico entre os processos de captação e depuração, os quais, por sua vez, são influenciados pelo equilíbrio dinâmico entre os poluentes na água e no organismo (FOSSATO; CANZONIER, 1976; LIVINGSTONE, 1991; VENIER; CANOVA, 1996).

Entretanto, a atividade da GST como parâmetro para estudos do stress oxidativo tem sido questionado por alguns autores pelo fato de sua indução ser também influenciada por fatores alimentares (EGAAS, 2000). Ao desenharmos os protocolos experimentais, que resultou no presente trabalho, tomou-se toda precaução em relação ao tipo de alimentação dos peixes durante o período de aclimatação, além da suspensão da alimentação durante as 96 horas, nas quais, os indivíduos ficaram em presença dos pesticidas.

O registro dos diferentes graus de ativação da GST em fígado mostrou-se bastante útil a respeito da toxicidade dos pesticidas e possibilitou a verificação da intensidade do efeito tóxico entre as amostras testes.

Rao (2006), ao analisar a resposta da GST hepática de *O. mossambicus* ao inseticida RPR-II, descreveu elevação de 79% na atividade enzimática, após



exposição ao organofosforado durante 30 dias. O autor observou ainda uma recuperação parcial quando os indivíduos foram transferidos para água controle, o que reflete a capacidade do órgão em desempenhar função de proteção ao organismo.

Ao analisar a resposta branquial para GST nos indivíduos submetidos aos tratamentos, verificou-se o mesmo padrão daquele descrito para o tecido hepático no que se refere à elevação da resposta enzimática. Entretanto, o percentual de ativação em presença do acefato foi 77,7%, bem superior ao obtido, para o mesmo organofosforado, no extrato hepático. Esta resposta pode ser comprovada ao se analisar os danos verificados nas lamelas brânquias, como destacados na Figura 11.

Os dados obtidos no presente trabalho estão de acordo com os descritos por Kavitha e Rao (2009), quando avaliam as respostas antioxidantes de GST em brânquias de *O. mossambicus*, submetidos ao organofosforado profenofos.

Analisando a resposta enzimática aos difenoconazol e sulfluramida observou-se que ambas foram significativas, porém menos intensas quando comparadas à resposta do acefato. Quanto à diferença do potencial indutor entre difenoconazol e sulfluramida, os resultados mostraram-se insignificantes. Essas análises mostraram consistência com as alterações morfológicas branquiais, observadas nos indivíduos submetidos aos defensivos agrícolas, cujas lesões induzem às respostas enzimáticas observadas. Esses padrões enzimáticos observados em resposta aos agroquímicos sugerem que, em um mesmo indivíduo, alguns órgãos são mais susceptíveis aos danos oxidativos.

A comparação entre atividades enzimáticas em indivíduos submetidos a diferentes tratamentos permite sugerir hipóteses quando aos resultados observados, principalmente quando ensaios são realizados em concentrações elevadas de princípios ativos. Na maioria das vezes, a resposta da GST é reduzida, como relatado por Liu et al., (2007), para presença de 30 mg/L de compostos orgânicos

perfluorinados, o que sugere falência na capacidade detoxificativa do órgão e ocorrência do stress oxidativo.

Resgatando as informações sobre as alterações hematológicas, histológicas e enzimáticas é possível estabelecer a importância dos marcadores biológicos na identificação e caracterização dos riscos de contaminação ambiental. Os biomarcadores constituem ferramentas sensíveis, assim como os organismos utilizados como bioindicadores, capazes de informar, de forma precisa, os efeitos tóxicos dos diversos agrotóxicos (EGAAS, 2000). A avaliação dos biomarcadores frente às várias substâncias tóxicas ainda constitui uma necessidade, devido, principalmente, ao desenvolvimento tecnológico, ou ainda à necessidade de sínteses de novos agrotóxicos capazes de dizimar ou reduzir o índice de novas pragas que a cada dia tornam-se mais resistentes aos químicos já conhecidos. As alterações bioquímicas, fisiológicas e comportamentais dos organismos aquáticos têm proporcionado amplo entendimento sobre o modo de ação dos vários contaminantes ambientais (EL-SAYED; SAAD; EL-BAHR, 2007; YADAV et al., 2009).

## 6.5 Alterações hematológicas

A variação dos parâmetros hematológicos nos animais está relacionada às mudanças ambientais e, nos peixes em particular, contribuem para o diagnóstico das condições mórbidas, aos quais estão submetidos (SILVEIRA; RIGORES, 1989; ANDERSON, 1974; ALDRIN et al., 1982). Entre as alterações que podem ser comprovadas, relaciona-se a resposta fisiológica do indivíduo, a deficiência no mecanismo de defesa não específica, além da resposta imune específica (SVOBODOVÁ et al., 2005).

Nas extensões sanguíneas do controle e dos submetidos aos acefato, difenoconazol e sulfluramida, as células de defesa orgânica observadas com maior frequência foram os linfócitos, como descrita também por Tavares-Dias; Faustino (1998) e

Tavares-Dias; Schalch; Martins (2000) ao estudarem as características hematológicas em *O. niloticus* cultivadas intensamente em pesque-pague. Entretanto, quando comparado o percentual sanguíneo total das células de defesa orgânica, observou-se uma considerável variação quando comparado aos descritos por Tavares-Dias; Faustino (1998). Esses resultados são compatíveis também com Azevedo et al., (2006) quando discutem a predominância das células mononucleares (linfócitos e macrófagos), em reações de defesa do organismo, e sua redução quando em situação de estresse.

Com relação aos indivíduos submetidos ao acefato, os percentuais de neutrófilos apresentaram significância estatística quando comparados ao controle, apresentando muitas vezes um quadro de neutrofilia ou neutropenia, enquanto nenhuma diferença foi observada entre controle, difenoconazol e sulfluramida.

Considerando a função dos neutrófilos e descartando a possibilidade dos indivíduos utilizados no presente ensaio apresentarem qualquer processo inflamatório, podemos supor uma reação ao estresse disparado pela presença do organofosforado, que foi mais intensa quando comparado aos dois outros agrotóxicos. A resposta dos indivíduos ao acefato está de acordo com os obtidos por Sasaki, Maita e Okamoto (2002) para truta, onde os neutrófilos são responsáveis por citotoxicidade não específica.

A resposta da tilápia submetida ao acefato foi significativa para os basófilos, e não significativa quando relacionadas aos tratamentos com o difenoconazol e sulfluramida. São poucos os estudos relacionados à resposta anafilática com liberação de histamina nos peixes teleósteos e a precisa função dos basófilos na circulação periférica desses indivíduos (BIELEK et al., 1999).

O estresse agudo, resultante dos impactos ambientais, pode ainda causar alterações significativas na série branca do sangue, onde se observa linfopenia, leucopenia com neutrofilia e, por vezes, se assemelha à clássica resposta leucocitária ao estresse em mamíferos (SVOBODOVÁ et al., 2005).

Entre os leucócitos, as células que ocorrem em maior percentual na circulação de peixes são os linfócitos, que estão relacionados aos processos inflamatórios, porém com função precisa ainda não bem esclarecida (LAMAS et al., 1994).

Segundo Vale, Afonso e Silva (2002), os neutrófilos são células fagocitárias que desempenham importante papel na defesa contra infecções além de possuírem sistema de agentes microbicidas. A função fagocitária foi confirmada pela presença de glicogênio e de importantes enzimas relacionadas ao processo. Tavares-Dias e Faustino (1998), ao estudarem a hematologia de *Oreochromis niloticus* sob efeitos da infestação por *Ichthyophthirius multifiliis* constatou percentuais elevados de neutrófilos e de monócitos nos indivíduos enfermos.

Por outro lado, nos mamíferos, os basófilos são células derivadas da medula óssea e responsável pela resposta imunológica, ao participarem dos processos alérgicos (BOCHNER; SCHLEIMER, 2001). Embora tenham capacidade de exercer função fagocitária, são menos específicos quando comparados aos neutrófilos (LORENZI, 1999).

De forma geral, ao se considerar estudos hematológicos em peixes teleósteos, observa-se a existência de muitas discussões relativas à hematologia ou aos órgãos hematopoiéticos das várias espécies (TAVARES-DIAS et al., 2002). Sabe-se, por exemplo, que o organismo animal apresenta uma série de alterações fisiológicas ao enfrentar situações adversas, que variam em intensidade, duração e dependem da variabilidade genética e domesticação do animal.

Estas respostas têm um objetivo que é preparar o animal para situações adversas, o que permite a adaptação e capacidade de administrar o foco estressor (BAGLIOLI, 2008). Ainda em relação ao processo de identificação das células sanguíneas, é importante relatar o descrito por Pimpão (2006), que considera difícil a identificação com a devida precisão, das células sanguíneas de peixes, sob efeitos toxicológicos, seguindo as metodologias estabelecidas.

## 6.6 Alterações histológicas

A exposição de peixes a agentes químicos perniciosos, presentes no ambiente, é registrada pelas alterações morfológicas observadas nas brânquias, que são essenciais para o desempenho de importantes processos fisiológicos como a respiração, osmorregulação, equilíbrio ácido-básico e excreção de resíduos nitrogenados. Alterações histológicas em brânquias têm sido descritas para vários teleósteos expostos a metais (ARELLANO; STORCH; SARASQUETE, 1999; BOECK et al., 2001; GARCIA-SANTOS; FONTAÍNHAS-FERNANDES; WILSON, 2006) e outros poluentes (VAN DEN HEUVEL et al., 2000; THOPHON et al., 2003; PANE; HAQUE; WOOD, 2004).

No presente estudo, a prevalência foi relatar as alterações branquiais resultantes da exposição de *O. niloticus* aos três agrotóxicos, e verificar a severidade de cada tratamento nas respostas histológicas. Quando comparados ao controle, os peixes expostos ao acefato apresentam progressivas modificações no epitélio interfilamentar e nos filamentos. Essas alterações refletem na aparência do eixo capilar do filamento e no epitélio interfilamentar.

A perda de modelagem e conseqüente apoptose filamentar são constantes nas brânquias submetidas ao organofosforado. A hipertrofia epitelial se caracteriza pelo aumento na sua espessura, com conseqüente obstrução da superfície de trocas gasosas nos filamentos.

Por outro lado, foi constatada maior freqüência de células mucócitas em vários filamentos, demonstrando mudanças no padrão epitelial interlamelar. Resultados semelhantes foram descritos por Jiraungkoorskul et al., 2003, ao estudarem o efeito de glifosato sobre *O. niloticus*. Após o tempo regulamentar do bioensaio, o progressivo aumento na proliferação epitelial resultou na fusão lamelar.

Em relação ao tratamento com difenoconazol, a desestruturação das lamelas foi também seguida por colabação pareada, o que diminui o espaço para circulação de

água e prejudica as trocas gasosas no processo respiratório. Outro episódio frequente nessas brânquias foi a proliferação do tecido interfilamentar, recobrando o filamento no sentido vertical. Os mucócitos ocorrem raramente enquanto que as células secretoras de cloreto se organizam formando clusteres e na seqüência, começam a sofrer processos de hidrólise. Bury et al., (1998) e Boeck et al., (2001), atribuem para o afinamento da estrutura, a redução das células mucócitas e de cloreto, e o conseqüente deslocamento de macrófagos e outros leucócitos, em resposta à necrose celular.

Alguns estudos revelaram que o edema intersticial é lesão muito freqüente em brânquias de peixes submetidos a metais pesados (MALLATT, 1985). O levantamento do epitélio lamelar é outra alteração histológica, provavelmente induzida pela incidência do edema (ARELLANO; STORCH; SARASQUETE, 1999; PANE; HAQUE; WOOD, 2004; SCHWAIGER et al., 2004).

Entretanto, edema como elevação epitelial e hiperplasia, pode ser considerado resposta adaptativa do indivíduo, já que aumentam a distância entre o meio externo e o sangue, funcionando assim como barreira protetora (SEPICI-DINÇEL et al., 2009), e estas alterações podem ser resultante da exposição a diferentes poluentes, como endosulfan (NOWAK et al., 1992), arsênico (HWANG; TSAI, 1993), drogas (SCHWAIGER et al., 2004) e metais pesados (KARSLSSON-NORGGREN et al., 1986; REIDA; MCDONALD, 1998; PANE; HAQUE; WOOD, 2004).

Os aneurismas foram previamente observados com uso de outras substâncias intoxicantes, cuja severidade variou de acordo com a espécie química e o tempo de exposição (VAN DEN HEUVEL et al., 2000; THOPHON et al., 2003; SCHWAIGER et al., 2004). No presente estudo, os aneurismas foram observados nos peixes submetidos aos três tratamentos.

Outra alteração observada é a dilatação da porção distal do filamento formando os báculos. O desenvolvimento dessa estrutura poderia estar relacionado às necessidades de maior aumento da superfície de trocas gasosas.

Finalmente, o tratamento realizado com sulfluramida mostrou-se o mais degenerativo quando comparado ao acefato e difenoconazol. A desestruturação dos filamentos foi acentuada com apoptose, acompanhados de edemas localizados. Outra característica que o diferenciou, em relação aos tratamentos anteriores, foi a ausência de células de cloreto e aumento do volume das células mucólicas.

## 7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos podemos concluir que:

- A espécie *Oreochromis niloticus* mostrou-se um bom indicador para o presente estudo;
- A presença de acefato reduziu os índices neutrófilos, indicativo de neutrofilia; elevou a resposta leucocitária, em relação aos basófilos, o que não ocorreu em relação aos demais tratamentos; induziu progressivas modificações no epitélio interfilamentar e nos filamentos de brânquias; foi o principal inibidor da AChE do cérebro;
- O difenoconazol e a sulfluramida não alterou o perfil dos leucócitos, quando comparados ao controle;
- O difenoconazol induziu a desestruturação das lamelas, a colabação dos filamentos, a redução das células mucócitas e células de cloreto;
- A sulfluramida induz apoptose acompanhado de edemas localizados, além de ausência de células de cloreto e hipertrofia das células mucócitas;
- A principal ação esterásica em cérebro é da AChE, enquanto que a BChE mostrou atividade rudimentar;
- Nas brânquias, as respostas acetilcolinesterásica e butirilcolinesterásica foram mais intensas, devido ser a brânquia, um órgão que faz maior contato com o meio impactante;
- A resposta plasmática da BChE foi mais intensa no plasma para o acefato;
- A ALP respondeu negativamente ao difenoconazol e à sulfluramida;
- A presença dos agrotóxicos resultou na elevação da atividade da GST no fígado, indicando resposta de proteção quanto ao agente estressante;
- Nas brânquias, a resposta da GST foi significativa somente para a presença do acefato enquanto que para os outros tratamentos, não ocorreu alteração significativa;



- Dos ensaios realizados no presente trabalho, somente o hematológico é que depende de ampliação nos seus estudos, enquanto que tanto as alterações histológicas quanto as enzimáticas constituem marcadores confiáveis na caracterização de alterações ambientais.

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tendo em vista os promissores resultados obtidos neste trabalho, torna-se primordial o aprofundamento dos estudos relativos aos aspectos toxicológicos, desses pesticidas, não somente nos indivíduos presentes nos corpos d'água, mas também nas pessoas envolvidas com a manipulação dos produtos nas lavouras. Dessa forma, os estudos poderiam ser desenvolvidos considerando os seguintes objetivos:

- Realizar testes no próprio ambiente que recebe todo o aporte de agroquímicos;
- Comparar os estudos realizados em laboratório com aquele a serem desenvolvido “*in situ*”;
- Analisar outros parâmetros enzimáticos e não-enzimáticos do estresse oxidativo em *O. niloticus*;
- Estudar os efeitos dos princípios não ativos, das formulações utilizadas;
- Determinar a concentração dos pesticidas nos tecidos do organismo utilizado como bioindicador;
- Desenvolver uma abordagem de educação ambiental junto à comunidade que utiliza os agroquímicos;
- Acompanhar possíveis alterações nas atividades enzimáticas, do plasma dos agricultores.

Os resultados poderão servir de suporte, para os órgãos municipais, nas tomadas de decisões relativas à prevenção de doenças e ao manejo correto dos pesticidas.

## 9 REFERÊNCIAS

- 1 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/s07.pdf>>. Acesso em: 14 jul. 2009.
- 2 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Disponível em: <[http://www4.anvisa.gov.br/AGROSIA/asp/frm\\_dados\\_ingrediente.asp?iVarAux=1&CodIng=7](http://www4.anvisa.gov.br/AGROSIA/asp/frm_dados_ingrediente.asp?iVarAux=1&CodIng=7)>. Acesso em 14 jul. 2009.
- 3 ALDRIN, J. F.; MESSENGER, J. L.; LAURENCIN, F. B. La biochimie clinique en aquaculture. Interet et perspective. CNEXO. **Actes Colloq.** 14. p. 219-326. 1982.
- 4 ALPUCHE-GUAL L., GOLD-BOUCHOT, G. Determination of esterase activity and characterization of cholinesterases in the reef fish *Haemulon plumieri*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 71. p. 787-797. 2008.
- 5 ALMEIDA, E. A. de et al. Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A 146. p. 588-600. 2007.
- 6 ANDERSON, D. P. **Fish Immunology**. New Jersey, T. F. H. Publications. Neptune. 1974. 239p.
- 7 ARAÚJO, S. M. M. et al. Uso de inseticidas organofosforados nos pólos de produção na Ilha de São Luís (MA): Condições de trabalho e contaminação de hortaliças. **Revista de Ecotoxicol e Meio Ambiente**. Curitiba. v. 11. p. 159-179. Jan/dez. 2001.
- 8 ARELLANO, J. M.; STORCH, V.; SARASQUETE, C. Histological changes and copper accumulation in liver and gills of the Senegales sole, *Solea senegalensis*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 44. p. 62-72. 1999.
- 9 ARIAS, A. R. L. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxico. **Ciência & Saúde Coletiva**. v. 12. n. 1. RJ. Janeiro/março 2007.

- 10 ARYSTA LIFESCIENCE – **Orthene 750 BR**. Disponível em: <[www.dupontagricola.com.br/upload/produto/Orthene\\_FISPQ.PDF](http://www.dupontagricola.com.br/upload/produto/Orthene_FISPQ.PDF)>. Acesso em 14 jul. 2009.
- 11 ATLI, G.; CANLI, M. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C 145. p. 282-287. 2007.
- 12 AZEVEDO, F. A. de; CHASIN, A. A. da M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Paulo: Rima. 2004. 340p.
- 13 AZEVEDO, T. M. P. de et al. Hematologia de *Oreochromis niloticus*: Comparação entre peixes mantidos em piscicultura consorciada com suínos e em pesque-pague no Vale do Rio Tijucas, Santa Catarina, Brasil. **B.Inst. Pesca** 32(1). São Paulo. p. 41-49. 2006.
- 14 BAGLIOLI, B. **Vitamina C Na Dieta E Influência Nas Respostas De Estresse E Resistência De Juvenis De Jundiá Expostos Ao Ictio**. Dissertação. 2008.
- 15 BARBIERI, E. **Pesticidas: um problema grave de saúde pública e ambiental**. 2006. Disponível em: <<http://abdl.org.br/article/view/2683/1/152>>. Acesso em 06 dez. 2007.
- 16 BARRED, A.J. **Lysosomal enzymes**. In: Dingle, J.T. (Ed.), *Lysosomoes: A Laboratory Handbook*. North-Holland, Amsterdam. p. 46-135. 1972.
- 17 BASIRI, S. et al. Improvement by *Satureja khuzestanica* essential oil of malathion-induced red blood cells acetylcholinesterase inhibition and altered hepatic mitochondrial glycogen phosphorylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase activities. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 89. p. 124-129. 2007.
- 18 BENINCÁ, C. 2006. **Biomonitoramento das Lagoas Estuarinas do Camacho – Jaguaruma (SC) e Santa Marta – Laguna (SC) Utilizando *Geophagus brasiliensis* (Cichlidae)**. Dissertação de Mestrado, Genética, UFP. Curitiba. 112 pp.
- 19 BERNARDES, F. 2007. **Finalmente, ES assina decreto para comitês do Rio Santa Maria e Jucu**. Vitória ES. Disponível em: <[http://www.seculodiario.com.br/arquivo/2007/outubro/09/noticiario/meio\\_a\\_mambiente](http://www.seculodiario.com.br/arquivo/2007/outubro/09/noticiario/meio_a_mambiente)>. Acesso em: 03 dez. 2007.

- 20 BHANTI, M.; TANEJA, A. Contamination of vegetables of different seasons with organophosphorus pesticides and related health risk assessment in northern India. **Chemosphere**, 69. p. 63-68. 2007.
- 21 BIELEK, E. et al. Depletion of head kidney neutrophils and cells with basophilic granules during peritoneal inflammation in the goldfish, *Carassius auratus*. **Folia Biol.** 47. p. 33-42. 1999.
- 22 BLASCO, J.; PUPPO, J.; SARASQUETE, M. C. Acid and alkaline phosphatases activities in the clam *Ruditapes philippinarum*. **Mar. Biol.** 115. p. 113-118. 1993.
- 23 BOCHNER, B. S.; SCHLEIMER, R. P. Mast cell, basophiles and eosinophils: distinct but overlapping pathways for recruitment. **Rev. Immunol.** 179. p. 5-15. 2001.
- 24 BOECK, G. de et al. Morphological and metabolic changes in common carp, *Cyprinus carpio*, during short-term copper exposure: interactions between  $Cu^{2+}$  and plasma cortisol elevation. **Environ. Toxicol. Chem.** 20. p. 374-381. 2001.
- 25 BORKOVIC, S. S. et al. Antioxidant defence enzyme activities in hepatopancreas, gills and muscle of Spiny Cheek Crayfish (*Orconectes limosus*) from the River Danube. **Comp. Biochem. Biophys.** C 147. p. 122-128. 2008.
- 26 BRETAUD, S.; TOUTANT, J. P.; SAGLIO, P. Effects of carbofuran, diuron, and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*). **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 47. p. 117-124. 2000.
- 27 BÜCKER, A.; CARVALHO, W.; ALVES-GOMES, J. A. Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. **Acta Amazônica**. v. 36. n. 3. Manaus 2006.
- 28 BURY, N. R. et al. Cortisol protects against copper induced necrosis and promotes apoptosis in fish gill chloride cells in vitro. **Aquatic. Toxicol.** 40. p. 193-202. 1998.
- 29 CAMPOS. S. de. **Tóxicos/intoxicações – Acefato organofosforado**. 2003. Disponível em: <<http://www.drashirleydecampos.com.br/noticias/8685>> Acesso em 14 jul. 2009.

- 30 CAVALIERE, M. F. et al. Miotoxicidade por organofosforados. **Revista de Saúde Pública**. v. 30, n. 3. SP. Junho 1996.
- 31 CERÓN, J. J. et al. Effects of diazinon exposure on cholinesterase activity in different tissues of European eel (*Anguilla anguilla*). **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 35. p. 222-225. 1996.
- 32 CHEMBLINK. Disponível em: < <http://www.chemblink.com/products/4151-50-2.htm>>. Acesso em: 14 jul. 2009.
- 33 COIMBRA, U. 2006. **Municípios elegem membros de comitê da Bacia do Rio Jucu. Vitória ES.** Disponível em: <<http://www.seculodiario.com.br/arquivo/2006>>. Acesso em: 03 dez. 2007.
- 34 CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resoluções vigentes publicadas entre julho de 1984 e maio de 2006. Brasília. 2006.
- 35 CRUZ, C.; NETO, J. M.; MENEZES, M. L. Toxicidade aguda do inseticida paration metílico e do biopesticida azadiractina de folhas de neen (*Azadirachta indica*) para alevino e juvenil de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Revista Ecotoxicol e Meio Ambiente**. Curitiba. v.14. p. 93-102. janeiro/dezembro 2004.
- 36 DI GIULIO, R. T. Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. **Environ. Toxicol. Chem.** 8. p. 1103-1123. 1989.
- 37 DONACHY, J. E.; WATABE, N.; SHOWMAN, R. M. Alkaline phosphatase and Carbonic anhydride activity associated with arm regeneration in the seaster *Asterias forbesi*. **Mar. Biol.** 145. p. 471-476. 1990.
- 38 DU, D. et al. Comparison of pesticide sensitivity by electrochemical test based on acetylcholinesterase biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, 23. p. 285-289. 2007.
- 39 EGAAS, E. Effects of atrazine, endosulfan and butylated hydroxyanisole on glutathione-S-transferases in *Orthosia gothica*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C 127. p. 117-122. 2000.
- 40 ELLMAN, G. L. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**. vol. 7. p. 88-95. 1961.

- 41 EL-SAYED, Y.S., SAAD, T.T., EL-BAHR, S.M. Acute intoxication of deltamethrin in monosex Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* with special reference to the clinical, biochemical and haematological effects. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 24. p. 212-217. 2007.
- 42 FARIA, N. M. X.; FASSA, A. G.; FACCHINI, L. A. Intoxicação por agrotóxicos no Brasil: os sistemas oficiais de informação e desafios para realização de estudos epidemiológicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, 12(1). p. 25-38. 2007.
- 43 FERNANDES, C. et al. Changes in plasma electrolytes and gill histopathology in wild *Liza saliens* from the Esmoriz-Paramos coastal lagoon. **Bull. Environ. Contam Toxicol.** 79. p. 301-305. 2007.
- 44 FICHA DE INFORMAÇÕES DE SEGURANÇA DE PRODUTOS QUÍMICOS – FISPQ. Março 2006. Disponível em: <<http://container2.netsite.com.br/dinagro/arquivos/486.doc>>. Acesso em: 14 jul. 2009.
- 45 FITZPATRICK, P. J. et al. Assessment of a glutathione S-transferase and related proteins in gill and digestive gland of *Mytilus edulis* (L.), as potencial organic pollution biomarkers. **Biomarkers**, 2. p. 51-56. 1997.
- 46 FOSSATO, V. U.; CANZONIER, W. J. Hydrocarbon uptake and loss by the mussel *Mytilus edulis*. **Mar. Biol.** 36. p. 243-250. 1976.
- 47 FUNDO DE AMPARO À PESQUISA DO ES. **Estudo hidrossedimentológico da Baía do Rio Jucu. 2006.** UFES *Departamento de Ecologia e Recursos Naturais*. Disponível em: <<http://www.dern.ufes.br/geo/fapesagua.html>>. Acesso em: 06 dez. 2007.
- 48 GARCIA-SANTOS S.; FONTAÍNHAS-FERNANDES, A.; WILSON, J. M. Cadmium tolerance in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following acute exposure: Assessment of some ionoregulatory parameters. **Environ. Toxicol.** 21(6). p. 33-46. 2006.
- 49 GARCIA-SANTOS, S. et al. Alterações histológicas em brânquias de tilápia nilótica *Oreochromis niloticus* causadas pelo cádmio. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.59, n.2. p.376-381. 2007.

- 50 GASSEN, D. N. **Oídio e míldio em soja**. Cooplantio. Disponível em: < <http://www.planetasoja.com/trabajos/trabajos800.php?id1=5402&publi=&idSec=10&id2=5403>>. Acesso em: 13 jul. 2009.
- 51 GASSEN, F. R. **Efeito de acidez da água sobre produtos fitossanitários**. Cooplantio. Disponível em: <[www.terraaviacao.com.br/061AguapH.pdf](http://www.terraaviacao.com.br/061AguapH.pdf)>. Acesso em: 15 jul. 2009.
- 52 GLUSCZAK, L. **Parâmetros toxicológicos em piavas e jundiás após exposição a uma formulação comercial de glifosato**. Tese de doutorado. Santa Maria, RS, Br. 2008.
- 53 GOOGLE EARTH. Disponível em: < [earth.google.com/intl/pt/](http://earth.google.com/intl/pt/)>. Acesso em: 21 jul. 2009.
- 54 GREENSTEIM, D. J.; ALZADJALI, S.; BAY, S. M. 1994. **Toxicity of ammonia to purple sea urchin (*Stongylocentrotus purpuratus*) embryos**. Disponível em: < <http://www.sccwrp.org/pubs/annrpt/94-95/art-07.htm>>. Acesso em 21 jul. 2009.
- 55 GUILHERMINO, L. et al. Inhibition of acetylcholinesterase activity as effect criterion in acute tests with juvenile *Daphnia magna*. **Chemosphere**, 32. p. 727-738. 1996.
- 56 HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases – the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **J. Biol. Chem.** 249. p. 7130-7139. 1974.
- 57 HOARAU, P. et al. Differential induction of glutathione S-transferases in the clam *Ruditapes decussates* exposed to organic compounds. **Environ. Toxicol. Chem.** 20. p. 523-529. 2001.
- 58 HOLEM R. R.; HOPKINS, W. A.; TALENT, L. G. Effects of repeated exposure to Malathion on growth, food consumption, and locomotor performance of the western fence lizard (*Sceloporus occidentalis*). **Environmental Pollution**. p. 1-7. 2007.
- 59 HWANG, P. P.; TSAI, Y. N. Effects of arsenic on osmoregulation in the tilapia *Oreochromis mossambicus* reared in seawater. **Mar. Biol.** 117. p. 551-558. 1993.
- 60 IGARANSKI, M. A. **Tilápia**. Disponível em: < <http://www.geocities.com/ctaufc/tilapia.htm>>. Acesso em: 13 nov. 2007.



- 61 JESUS, T. B. de, CARVALHO, C. E. V. de. Utilização de Biomarcadores em Peixes como Ferramenta para Avaliação de Contaminação Ambiental por Mercúrio (Hg). **Oecol. Bras.** 12 (4). p. 680-693. 2008.
- 62 JIRAUNGKOORSKUL, W. et al. Biochemical and histopathological effects of glyphosate herbicide on Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Environm. Toxicol.** 18. p. 260-267. 2003.
- 63 JULIATTI, F. C. **Modo de ação dos fungicidas sobre plantas e fungos.** Disponível em: <[www.ipni.net/ppiweb/pbrazil.../Anais%20Fernando%20Juliatti.pdf](http://www.ipni.net/ppiweb/pbrazil.../Anais%20Fernando%20Juliatti.pdf)>. Acesso em: 13 jul. 2009.
- 64 KAPPUS, H. Overview of enzymes systems involved in bio-reduction of drugs and in redox cycling. **Biochem. Pharmacol.** 35 (1). p. 1-6. 1986.
- 65 KARLSSON\_NORGGREN, L. et al. Acid water and aluminium exposure: gill lesions and aluminium accumulation in farmed, brown trout, *Salmo trutta*. L. **J. Fish Dis.** 9. p. 1-9. 1986.
- 66 KAVITTHA, P.; RAO, J. V. Sub-lethal effects of profenofos on tissue-specific antioxidative responses in a Euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus*. **Ecotoxicol. Environm. Saf.** 72. p. 1727-1733. 2009.
- 67 KIM, D. E. A strategy for assessing the effects of xenobiotics on fish reproduction. **Sci. Total Environ.** 225. p. 3-11. 1999.
- 68 KONWICK, B. J. et al. Bioaccumulation and biotransformation of chiral triazole fungicides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquatic Toxicology**, 80. p. 372-381. 2006.
- 69 KRALJ, M. et al. Comparison of photocatalysis and photolysis of Malathion, isomalathion, malaaxon, and commercial Malathion – Products and toxicity studies. **Water Research**, 41. p. 4504-4514. 2007.
- 70 KRÜGER, E. Uma abordagem sistêmica da atual crise ambiental. **Desenvolvimento e meio ambiente**, 4. p. 37-43. 2001.
- 71 LAMAS, J. et al. Non-specific cellular responses of rainbow trout to *Vibrio anguillarum* and its extracellular products (ECPs). **J. Fish Biol.** 45. p. 839-854. 1994.

- 72 LARANJEIRO, A. J.; ZANÚNCIO, J. C. **Avaliação da isca à base de sulfluramida no controle de *Atta sexdens rubropilosa* pelo processo dosagem única de aplicação.** Nota Técnica. IPEF 48/49. p. 144-152. jan./dez. 1995.
- 73 LA TORRE, F. R. de; FERRARI, L.; SALIBIÁN, A. Freshwater pollution biomarker: response of brain acetylcholinesterase activity in two fish species. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C** 131. p. 271-280. 2002.
- 74 LI, Mei-Hui. Effects of nonylphenol on cholinesterase and carboxylesterase activities in male guppies (*Poecilia reticulata*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 71. p. 781-786. 2008.
- 75 LIU, C. et al. Induction of oxidative stress and apoptosis and PFOS and PFOA in primary cultured hepatocytes of freshwater tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquatic Toxicol.** 82. p. 135-143. 2007.
- 76 LIVINGSTONE, D. R. **Organic xenobiotic metabolism in marine invertebrates.** In: gilles, R. (Ed.), *Advances in Comparative and Environmental Physiology*, 7th edition. Springer-Verlag, Berlin. 1991. 45-185 p.
- 77 LORENZI, T. F. **Manual de hematologia propedêutica e clinica.** São Paulo, MDSI. 1999. 641p.
- 78 LOWRY, O. H. et al. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. **J. Biol. Chem.** 193. p. 265-275. 1951.
- 79 LUSHCHAK, V. I. Budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model to study oxidative modification of proteins in eukaryotes. **Acta Biochimica Polonica.** v. 53, n. 4. p. 679-684. 2006.
- 80 MAIBECK, M.; CHAPMAN, D. V.; HELMER, R. **Anthropogenic Impacts on Water Quality.** In: *Global Freshwater Quality* Blackwell (eds), London. 1990. 306p.
- 81 MALLATT J. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** 42. p. 630-648. 1985.
- 82 MARTINEZ-ÁLVAREZ, R. M.; MORALES, A. E.; SANZ, A. Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors. **Rev. Fish Biol. Fish.** 15. 2005.

- 83 MARTOJA, R.; MARTOJA-PIERSON, M. Técnicas em histologia Animal. **Toray Masson**, Barcelona. p. 350. 1970.
- 84 MELO, G. C. de et al. Hepatic alterations in the fish *Rhamdia quelen* contaminated with Folidol 600®. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 71. p. 821-829. 2008.
- 85 MEURER, F. et al. *Saccharomyces cerevisiae* como probiótico para alevinos de tilápia-do-Nilo submetidos a desafio sanitário. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 36. n 05. p.1219-1224. setembro/outubro, 2007.
- 86 MICROMAL. **A saúde da água**. Disponível em: <[www.micronal.com.br/.../saude\\_agua.htm](http://www.micronal.com.br/.../saude_agua.htm)>. Acesso em: 15 jul. 2009.
- 87 MILENIA. Disponível em: <[www.milenia.com.br/.../Sulfloramida%20Tecnica%20Milenia%20-%20FISPQ.pdf](http://www.milenia.com.br/.../Sulfloramida%20Tecnica%20Milenia%20-%20FISPQ.pdf)>. Acesso em: 14 jul. 2009.
- 88 MONTEIRO, S. M. et al. Copper induced alterations of biochemical parameters in the gill and plasma of *Oreochromis niloticus*. **Comp. Biochem. Physiol.** 141. p. 375-383. 2005
- 89 MONTEIRO, S. M. et al. A stereological study of copper toxicity in gills of *Oreochromis niloticus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 72. p. 213-223. 2009.
- 90 MORENO, I. et al. Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to microcystin-LR administered intraperitoneally. **Toxicol.** 45. p. 395-402. 2005.
- 91 NASCIMENTO, I. A.; SOUSA, E. C. P. M.; NIPPER, M. **Métodos em ecotoxicologia marinha**: Aplicação no Brasil. São Paulo: Artes Gráficas e Indústria Ltda., 2002. 262 p.
- 92 NOWAK, B. F. et al. Scanning electron microscopy in aquatic toxicology. **J. Computer-Assisted Microsc.** 4. p. 241-246. 1992.
- 93 PANE, E. F.; HAQUE, A.; WOOD, C. M. Mechanistic analysis of acute, Ni-induced respiratory toxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): an exclusively branchial phenomenon. **Aquat. Toxicol.** 69. p. 11-24. 2004.

- 94 PAYNE, J. F. A.; MATHIEU, W. M.; FANCEY, L. L. Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future. Field trials in association with two urban rivers and paper mill in Newfoundland. **Mar. Pollut. Bull.** 32. p. 225-231. 1996.
- 95 PEAKALL, D. **Animal Biomarkers as Pollution Indicators**. Chapman and Hall, London, UK, 1992.
- 96 PERES, F. et al. Desafios ao estudo da contaminação humana e ambiental por agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, 10(Sup). p. 27-37. 2005.
- 97 PERKINS, E. J.; SCHLENK, D. In vivo acetylcholinesterase inhibition, metabolism, and toxicokinetics of aldicarb in channel catfish: role of biotransformation in acute toxicity. **Toxicol. Sci.** 53. p. 308-315. 2000.
- 98 PETERSEN, I. L. et al. Metabolic effects in rapeseed (*Brassica napus* L.) seedlings after root exposure to glyphosate. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 89. p. 220-229. 2007.
- 99 PETTS, G.; CALOW, P. **River Biota: Diversity and dynamics**. Blackwell Science (eds) Inc., Cambridge, MA. 1966. 264p.
- 100 PIMPÃO, C. T. **Avaliação aguda dos efeitos toxicológicos da deltametrina em uma espécie de peixe fluvial nativo: Estudo Bioquímico e Imunotóxico**. Tese de Doutorado da Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2006. 116 p.
- 101 PREVODNIK, A. et al. Oxidative stress in response to xenobiotics in the blue mussel *Mytilus edulis* L.: Evidence for variation along a natural salinity gradient of the Baltic Sea. **Aquatic Toxicology**, 82. p. 63-71. 2007.
- 102 I FÓRUM NACIONAL DE CARVÃO VEGETAL. 2008. Belo Horizonte. Outubro. Disponível em: < <http://painelflorestal.com.br/upload/unibras.pdf>>. Acesso em: 14 jul. 2009.
- 103 RAO, J. V. Sublethal effects of an organophosphorus insecticide (RPR-II) on biochemical parameters of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C. 143. p. 492-498, 2006.

- 104 REIDA, S. D.; MCDONALD, D. G. Effects of cadmium, copper and low pH on ion fluxes in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Can. **J. Fish. Aquat. Sci.** 45. p. 244-253. 1988.
- 105 RENDÓN-VON OSTEN, J. et al. In vivo evaluation of three biomarkers in the mosquitofish (*Gambusia yucatana*) exposed to pesticides. **Chemosphere**, 58. p. 627-639. 2005.
- 106 REZG, R. et al. Effect of subchronic exposure to Malathion on metabolic parameters in the rat. **Comptes Rendus Biologies**. p. 143-147. 2007.
- 107 RIBEIRO, E. A. **Efeitos de Concentrações Subletais dos Hidrocarbonetos Poli aromáticos Específicos BTX (Benzeno, Tolueno e Xileno) no Peixe *Sphoeroides testudineus* (Linnaeus, 1758) através de Biomarcadores Bioquímicos e Histológicos.** Tese de doutorado da Universidade Federal do Paraná. Curitiba. p. 61. 2007.
- 108 ROMÃO, S. et al. Blood parameter analysis and morphological alterations as biomarkers on the health of *Hoplias malabaricus* and *Geophagus brasiliensis*. **Brasilian Archives of Biology and Technology**. v. 49, n. 3. p. 441-448. 2006.
- 109 ROMERO, M. C.; ANSALDO, M.; LOVRIH G. A. Effectos of aerial exposure on the antioxidant status in the subantarctic stone crab *Paralomis granulosa* (Decapoda: Anomura). **Comp. Biochem. Biophys**, Part C 143. p. 6-11. 2006.
- 110 RUDNICKI, C. A. M. **Análise qualitativa e quantitativa das histopatologias causadas pelo organofosforado Azodrin®400 sobre o tecido branquial do peixe de água doce *Piaractus mesopotamicus*.** Dissertação. Curitiba. 2004.
- 111 SANCHO, E.; FERRANDO, M. D.; ANDREU, E. Response and recovery of acetylcholinesterase activity in the European Eel *Anguilla anguilla* exposed to fenitrothion. **J. Environ. Sci. Health**, B32 (6). p. 915-928. 1997.
- 112 SANCHO, E.; CERÓN, J. J.; FERRANDO, M. D. Cholinesterase activity and hematological parameters as biomarkers of sublethal molinate exposure in *Anguilla anguilla*. **Ecotoxicol. Environm. Saf.** 46. p. 81-86. 2000.

- 113 SANTOS, V. M. R. dos et al. Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. **Química Nova**. v. 30, n. 1. São Paulo Jan./Feb. 2007.
- 114 SASAKI, Y.; MAITA, M.; OKAMOTO, N. Rainbow trout neutrophils are responsible for non-specific cytotoxicity. **Fish & Shellfish Immunol.** 12. p. 243-252. 2002.
- 115 SCHWAIGER, J. et al. Toxic effects of the non ion-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part I: Histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. **Aquat. Toxicol.** 68. p. 141-150. 2004.
- 116 SEPICI-DINÇEL, A. et al. Sublethal cyfluthrin toxicity to carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings: Biochemical, hematological, histopathological alterations. **Ecotoxicol. Environm. Saf.** 72. p. 1433-1439. 2009.
- 117 SIES, H. Strategies of antioxidant. **Eur. J. Biochem.** 215. p. 213-219.1993.
- 118 SIGMA-ALDRICH. Disponível em: <  
[http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?N4=36531%7CFLUKA&N5=SEARCH\\_CONCAT\\_PNO%7CBRAND\\_KEY&F=SPEC](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?N4=36531%7CFLUKA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO%7CBRAND_KEY&F=SPEC)>. Acesso em: 13 jul. 2009.
- 119 SILVA, F. C., CARDEAL, Z. L., CARVALHO, C. R. Determinação de pesticidas organofosforados em água usando microextração em fase sólida e CGAR-EM. **Química Nova**. v.22, n.2. São Paulo. Mar./ abr. 1999.
- 120 SILVA, J. M. da et al. Agrotóxico e trabalho: uma combinação perigosa para a saúde do trabalhador rural. **Ciência & Saúde Coletiva**, 10 (4). p. 891-903. 2005.
- 121 SILVA, A. P. da et al. Temporal effects of newly developed oximes (K027, K048) on malathion-induced acetylcholinesterase inhibition and lipid peroxidation in mouse prefrontal cortex. **Neurotoxicology**. Outubro 2007.
- 122 SILVEIRA, R.; RIGORES, C. Características hematológicas noemais de *Oreochromis aureus* em cultivo. **Rev. Lat. Acui.** 39. p. 54-56. 1989.
- 123 STOPPELLI, I. M. B. S.; MAGALHÃES, C. P. Saúde e segurança alimentar: a questão dos agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva** 10 (sup). p. 91-100. 2005.

- 124 STURM, A.; ASSIS, H. C. S.; HANSEN, P. D. Cholinesterases of marine teleost fish. Enzymological characterization and potencial use in monitoring of neurotoxic contamination. **Mar. Environm. Res.** 47. p. 389-398. 1999.
- 125 SVOBODOVÁ, Z. et al. Haematological and biochemical profiles of carp blood following nitrite exposure at different concentrations of chloride. **Aquaculture Research**, 36. p. 1177-1184, 2005.
- 126 SYNGENTA. **Score.** Disponível em: <  
www.syngenta.com.br/website/...e.../fungicidas/>. Acesso em: 12 jul. 2007.
- 127 TAKAHASHI, Y. et al. Impact of pretilachlor herbicide and pyridaphenthion insecticide on aquatic organisms in model streams. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 67. p. 227-239. 2007.
- 128 TAVARES-DIAS, M.; FAUSTINO, C. D. Parâmetros hematológicos da tilápia-do-nilo *Oreochromis niloticus* (Cichlidae) em cultivo extensivo. **Ars. Veterinária**, 14. Jaboticabal. p. 254-263. 1998.
- 129 TAVARES-DIAS, M. et al. Hematologia de teleósteos brasileiros com infecção parasitária. I. Variáveis do *Leoporinus macrocephalus* Garavelo e Britski, 1988 (Anostomidae) e *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Characidae). **Acta Scientiarum**, 21(2). p. 337-342. 1999.
- 130 TAVARES-DIAS, M.; SCHALCH, S. H. C.; MARTINS, M. L. Características hematológicas de *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) cultivadas intensivamente em “Pesque-Pague” do Município de Franca, São Paulo, Brasil. **Ars. Veterinária**, 16. Jaboticabal. p. 76-82. 2000.
- 131 TAVARES-DIAS, M. et al. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. IV. Variáveis do jundiá *Rhamdia quelen* (PIMELODIDAE). **Ciência Rural**. Santa Maria. v. 32, n. 4. p. 693-698. 2002.
- 132 TAVARES-DIAS, M.; MATAQUEIRO, M. I. Características hematológicas, bioquímicas e biométricas de *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae) oriundos de cultivo intensivo. **Acta Scientiarum Biological Sciences**. Maringá, v. 26, n. 2. p. 157-162. 2004.
- 133 TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. de. **Hematologia de Peixes Teleósteos**. Villimpress Complexo Gráfico. 2004. 114 p.
- 134 THOMPSON, H. M. Esterases as markers of exposure to organophosphates and carbates. **Ecotoxicology**, 8. p. 369-336. 1999.

- 135 THOPHON, S. et al. Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. **Environm. Poll.** 121. p. 307-320. 2003.
- 136 TU, H. T. et al. Acetylcholinesterase activity as a biomarker of exposure to antibiotics and pesticides in black tiger shimp (*Penaeus monodon*). **Ecotoxicol. Environm. Saf**, 72. p. 1463-1470. 2009.
- 137 UEDA, I. K. et al. Estudos hematológicos em *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) (Cichlidae, Teleostei) – Parte I. **Brazilian Journal of Veterinary research and Animal Science**, 34. São Paulo. p. 270-275. 1997.
- 138 VALDIVIA, P. A. et al. Basic oxidative stress metabolites in eastern Pacific green turtles (*Chelonia mydas agassizii*). **Comp. Biochem. Biophys**, Part C. In press. 2006.
- 139 VALE, A.; AFONSO, A.; SILVA, M. T. The professional phagocytes of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): cytochemical characterization of neutrophils and macrophages in the normal and inflamed peritoneal cavity. **Fish Shellfish & Immunol**, 13. p. 183-198. 2002.
- 140 VAN DEN HEUVEL, M. R. et al. Disease and gill lesions in yellow perch (*Perca flavescens*) exposed to oil sands mining-associated water. **Ecotoxicol. Environ. Saf**, 46. p. 334-341. 2000.
- 141 VARÓ, I.; AMAT, F.; NAVARRO, J. C. Acute toxicity of dichlorvos to *Aphanius iberus* (Cuvier & Valenciennes, 1846) and its anti-cholinesterase effects on this species. **Aquatic Toxicology**, 88. p. 53-61. 2008.
- 142 VEIGA, M. M. et al. Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 22 n.11. Rio de Janeiro nov. 2006.
- 143 VERNIER, P.; CANOVA, S. Formation of DNA adducts in the gill tissues of *Mytilus galloprovincialis* treated with benzo[a]purene. **Aquat. Toxicol**, 34. p. 119-133. 1996.
- 144 VIARENGO, A. et al. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C 146. p. 281-300. 2007.



- 145 WILSON, J. M.; LAURENT, P. Fish Gill Morphology: Inside out. **J. Exp. Zool**, 293. p. 192-213. 2002.
- 146 WINKALER et al. Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná. **Acta Scientiarum**. v. 23, n. 2. p. 507-514. 2001.
- 147 YADAV, A. et al. Acetylcholinesterase: a potential biochemical indicator for biomonitoring of fertilizer industry effluent toxicity in freshwater teleost, *Channa striatus*. **Ecotoxicology**, 18. p. 325-333. 2009.
- 148 YEN, J. H.; LINK, H.; WANG, Y. S. Potential of the insecticides acephate and methamidophos to contaminate groundwater. **Ecotoxicol. Environ. Safety**, 45. p. 79-86. 2000.
- 149 ZHANG, Y. et al. Prediction for the mixture toxicity of six organophosphorus pesticides to the luminescent bacterium Q67. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 71. p. 880-888. 2008.
- 150 ZHOU, Q. et al. Action mechanisms of acetolactate synthase-inhibiting herbicides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 89. p. 89-96. 2007.