



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013  
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

**ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS EM TILÁPIAS DECORRENTES DA EXPOSIÇÃO A UMA  
MISTURA DE TRÊS HERBICIDAS**

Eliane Alves de **Oliveira**<sup>1a</sup>; Claudio M. **Jonsson**<sup>1b</sup>; Zaira **Clemente**<sup>1c</sup>; José Henrique  
**Vallim**<sup>1c</sup>; Mônica Accaui M. M. e **Mello**<sup>2c</sup>

<sup>1</sup> Embrapa Meio ambiente; <sup>2</sup>Instituto Biológico

**Nº 13404**

**RESUMO** – O cultivo da cana de açúcar no Brasil utiliza grandes quantidades de herbicidas, o que constitui um sério risco para a biota aquática, se o manejo dos mesmos não for adequado. Uma prática comum é a aplicação de mistura de herbicidas. No presente trabalho avaliaram-se alterações da atividade de enzimas hepáticas de tilápias (*Oreochromis niloticus*) expostas em condições subletais a uma mistura diurom+hexazinona+tebutiuram. Mesmo em concentrações mais baixas das que manifestam efeitos agudos, enzimas antioxidantes e que auxiliam na eliminação do xenobióticos; Foram alteradas quanto ao seu padrão de normalidade. Os dados contribuem para o estabelecimento de concentrações máximas permissíveis de herbicidas no compartimento aquático e na identificação de biomarcadores através de enzimas catalase, superóxido dismutase, glutatona-S-transferase e glutatona peroxidase e de exposição a esses poluentes.

**Palavras-chaves:** peixe, toxicidade, *Oreochromis niloticus*, herbicida, enzima

<sup>a</sup> Bolsista CNPq: Graduação em Engenharia Ambiental e Sanitária, PUC, Campinas-SP. E-mail: elia59@live.com

<sup>b</sup> Orientador: Pesquisador Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP. E-mail: claudio.jonsson@embrapa.br

<sup>c</sup> Colaborador: Doutoranda em Biologia Funcional e Molecular . E-mail: zairaclemente@hotmail.com

<sup>c</sup> Colaborador: Mestrado em Biotecnologia Médica. E-mail: jose.vallim@embrapa.br

<sup>c</sup> Colaborador: Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais . E-mail: monica\_moura@biologico.sp.gov.br



## VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013

13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

**ABSTRACT-** *The cultivation of sugar cane in Brazil uses large amounts of herbicides. This fact is a serious risk to the aquatic biota, if the management adopting not appropriate. A common practice is to apply herbicides mixtures. In the present study we evaluated activity changes of hepatic enzymes of “tilapias” (Oreochromis niloticus) exposed to sublethal concentrations of the mixture diuron + hexazinone + tebuthiuron. Even at much lower concentrations than the acute effects, it was observed a change from the normal pattern of enzyme activity. These enzymes act as antioxidants and aid in the elimination process of the xenobiotics. The data contribute in establishing maximum permissible concentrations of herbicides in aquatic compartments and in the identification of biomarkers of exposure related to these pollutants.*

**Key-words:** fish, toxicity, *Oreochromis niloticus*, herbicide, enzyme

### 1 INTRODUÇÃO

As águas superficiais e subterrâneas são passíveis de serem contaminadas por fontes de poluição difusa, tais como as atividades agrícolas. A perda de herbicidas nestas atividades, utilizada para o controle de plantas daninhas, constitui um sério risco para a qualidade das águas.

Segundo fontes do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), o Estado de São Paulo é o maior produtor nacional de cana-de-açúcar, responsável por 53% da produção, que deve alcançar em 2013 cerca de 382,9 milhões de toneladas neste estado.

O risco potencial de contaminação ambiental pelas moléculas que não atingem o alvo (planta) decorre de sua capacidade de lixiviação através do solo, atingindo corpos de águas subterrâneas que afloram em águas superficiais. Estas podem também ser contaminadas pelo escoamento superficial de águas de chuvas.

Segundo a Instrução Normativa n. 46 de julho de 2002, publicada pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), a mistura de agrotóxicos em tanques é proibida, entretanto, sabe-se que é uma prática comum. O uso de mais de um componente é visto como vantagem devido ao sinergismo, pois se reduz o custo de pulverização e da dose recomendada. Além de aumentar o número de espécies controladas. Apesar destas vantagens sobre a mistura de herbicidas no combate a plantas invasoras, tais misturas podem potencializar seus efeitos tóxicos



## VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013 13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

em organismos não-alvo. Somente as misturas comerciais registradas no MAPA e na ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde) têm seu uso liberado.

A contaminação das águas por herbicidas, ainda que em concentrações subletais, pode levar inicialmente à alteração de uma reação bioquímica em um determinado organismo. Enzimas que atuam como antioxidantes tais como a catalase, superóxido dismutase, glutathione-S-transferase e glutathione peroxidase têm sido estudadas como biomarcadoras em decorrência do estresse oxidativo ocasionado pela presença de agrotóxicos em compartimentos ambientais. O produto comercial Velpar K WG® é uma mistura dos herbicidas diurom e hexazinona, e as usinas de cana-de-açúcar do Estado de São Paulo misturam este produto com o herbicida tebutiurom. No presente trabalho são apresentados os efeitos dessa mistura, de uso proibido no território nacional, na alteração da atividade de algumas enzimas antioxidantes de tilápias. Este peixe é amplamente distribuído no território nacional e criado nos mais diversos sistemas de produção graças ao seu relevante interesse comercial (Santos et. al., 2007).

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

**Material-teste:** Foi testada uma mistura, de uso proibido, de formulações de herbicidas à base de diurom + hexazinona (Velpar K WG; granulado dispersível; 468 + 132 g Kg<sup>-1</sup> respectivamente) e à base de tebutiurom ( Combine 500 SC; suspensão concentrada; 500 g L<sup>-1</sup>), oriundas de apresentações comerciais disponíveis no mercado.

**Organismo-teste e exposição :** Utilizaram-se tilápias (*Oreochromis niloticus*) pesando em média 33,48 ± 6,15 g e medindo em média 9,98 ± 0,56 cm. Estas foram distribuídas em seis tanques de polietileno com volume útil de 115 L. Os peixes foram alimentados *ad libitum* com ração comercial duas vezes ao dia, e o excedente de alimento e excretas, sifonados. A água ou soluções-teste foram repostas a cada dois/três dias. As unidades experimentais foram mantidas em sala climatizadas com fotoperíodo de 16h:8h (claro:escuro) e temperatura (26±2 °C) controlados, e aeração constante fornecida por um minicompressor de ar e pedra porosa. A água utilizada foi proveniente de poço artesiano, com as seguintes características: pH=7,7; oxigênio dissolvido=6,2 mg L<sup>-1</sup> e condutividade elétrica =3.800 µS cm<sup>-1</sup>.

Após uma aclimação prévia de pelo menos uma semana, os peixes foram expostos a duas concentrações-teste subletais de uma mistura de diurom+hexazinona+tebutiurom (0,21+0,06+0,16 e 2,1+0,6+1,6 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente), com base nas proporções de aplicação



## VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013 13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

dos herbicidas em campo. Assim, cada concentração-teste continha 0,43 e 4,3 mg L<sup>-1</sup> de massa total dos herbicidas. Isto corresponde a 1/100 e 1/10, respectivamente, da concentração letal média de exposição por 96 h (CL50-96h) determinada em estudos anteriores (Moura et al., 2012).

De cada tanque contendo a concentração-teste em duplicata, foram amostrados 3 peixes aos 7 e aos 14 dias da exposição (fase de assimilação). Após o término desta fase, os peixes foram mantidos durante 14 dias em água isenta dos xenobióticos, sendo que as amostragens foram realizadas no sétimo e no último dia (14<sup>o</sup> dia) desta fase de depuração.

Os animais foram sacrificados utilizando-se uma dose letal de benzocaína (>190 µg.L<sup>-1</sup>) e realizou-se imediatamente a necrópsia para a extração dos fígados. Estes foram armazenados em ultrafreezer (-80°C) até o seu processamento.

**Preparo das amostras:** O fígado foi pesado e homogeneizado em tampão fosfato 0,5M pH 7 (1:4 w/v). Os homogenatos foram centrifugados a 10.000 x g, durante 20 min, a 4 °C. Alíquotas do sobrenadante foram armazenadas em tubos *ependorf*, a -80 °C, para posteriores análises bioquímicas. As atividades de catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione-S-transferase (GST) e concentração de proteínas foram determinadas segundo Clemente et al. (2013). A atividade da glutathione peroxidase (GPx) foi analisada conforme o método descrito por Catalgol et al., 2007.

**Análise estatística:** Para investigar os efeitos dos tratamentos sobre as variáveis resposta, foram utilizados modelos lineares generalizados (GLM). Para as variáveis onde houve evidência de variâncias heterogêneas, o GLM foi ajustado pelo método dos quadrados mínimos ponderados, considerando as variâncias de cada tratamento como pesos. As análises foram realizadas utilizando o software estatístico Statgraphics Plus 5.1 (MANUGISTICS, 2001). Diferenças entre os grupos que serviram como controle e os grupos expostos aos herbicidas foram consideradas significativas ( $p < 0,05$ ) ou marginalmente significativas ( $0,08 > p > 0,05$ ), segundo o critério adotado por Branco et al. (2011).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

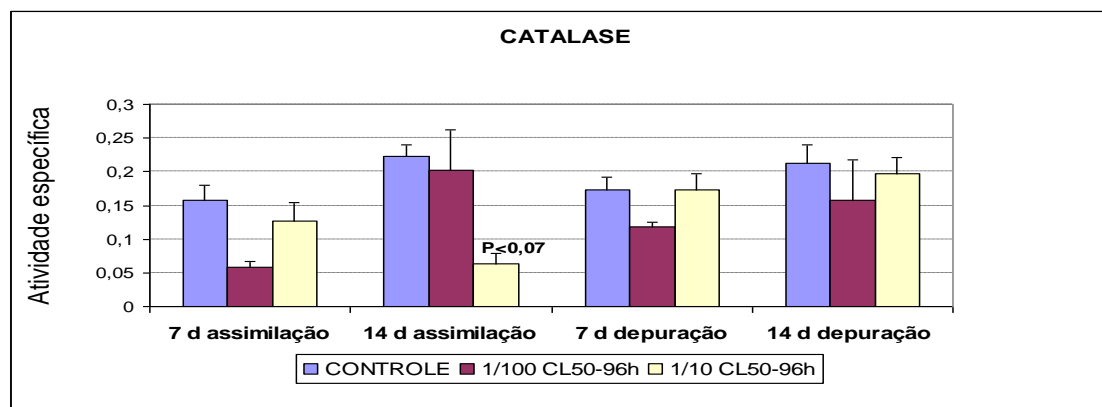
Os resultados referentes às exposições dos peixes à mistura dos herbicidas nas duas concentrações avaliadas estão apresentados nas Figuras 1 a 4.

Os dados demonstram que somente no 14<sup>o</sup> dia da fase de assimilação, na maior concentração testada, houve inibição da atividade da CAT com significância marginal a nível 93% de certeza .

Durante essa fase também observou-se aumento da atividade da GST no 7<sup>o</sup> ( $p < 0,09$ ) e no 14<sup>o</sup> dia ( $p < 0,06$ ) de exposição aos herbicidas. As alterações das atividades dessas duas enzimas, embora tenham significância marginal, ou próxima da marginal, sugerem uma moderada evidência de efeito. As observações no 14<sup>o</sup> dia de assimilação estão de acordo com o maior tempo de exposição necessário para a ocorrência das alterações observadas.

Uma alta evidência ( $p < 0,02$ ) de efeito relacionado à inibição da atividade foi constatada para a GPx após a primeira semana da fase de detoxificação nos tanques onde os organismos foram expostos à maior concentração da mistura. Não foram observadas alterações significativas ou marginalmente significativas quanto à atividade da SOD.

Além de ser considerada uma enzima antioxidante, a GST é responsável pela detoxificação e eliminação de compostos eletrofílicos, incluindo agroquímicos. Sua estimulação envolve reações de conjugação na presença de glutatona. No presente trabalho, o acréscimo da sua atividade pode estar relacionada à indução de síntese desta enzima durante a fase de assimilação.

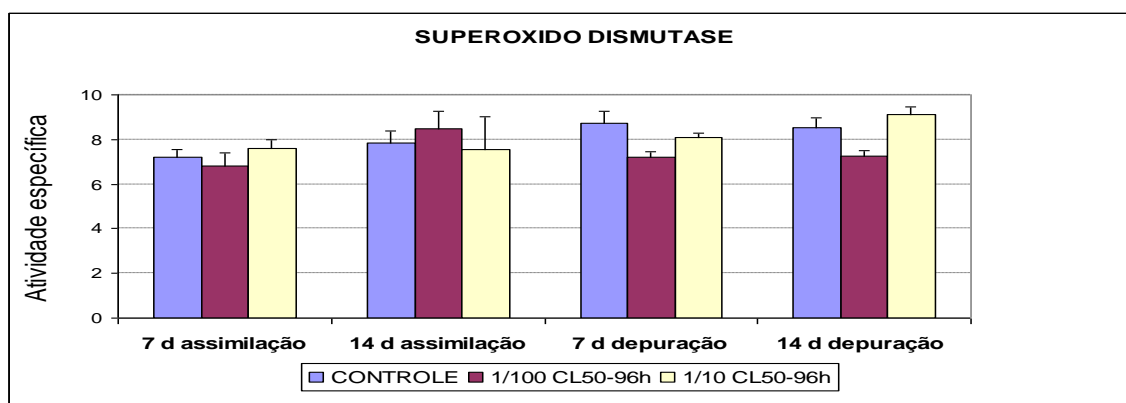


**Figura 1.** Atividade da CAT ( $\text{mmol H}_2\text{O}_2$  degradado  $\text{min}^{-1}$   $\text{mg proteína}^{-1}$ ) em tilápias expostas à mistura de diurom+hexazinona+tebutiurum em duas concentrações subletais durante 14 dias, seguido da fase de depuração. Os valores se referem às médias  $\pm$  erro-padrão. Valor “p” calculado em relação ao controle do mesmo período.

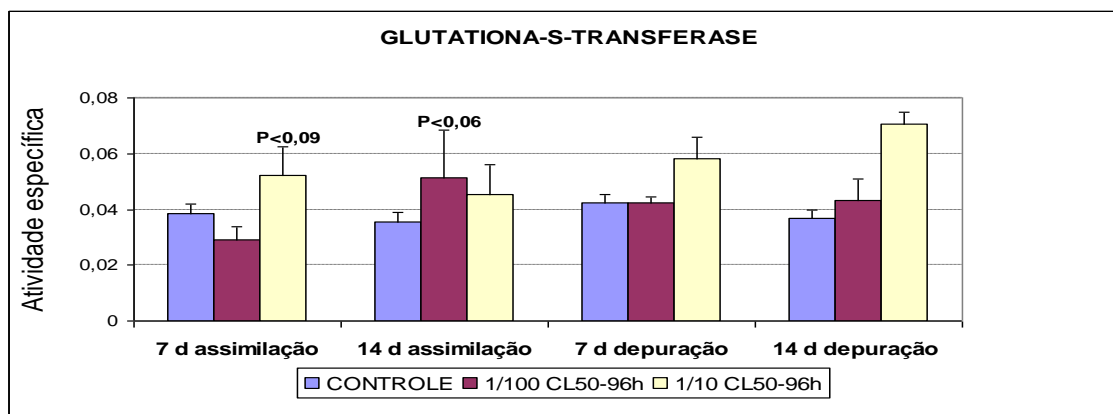
Embora as enzimas envolvidas na neutralização dos efeitos ocasionados pelo estresse oxidativo tenham sua expressão aumentada, pode também ocorrer a inibição da sua atividade, tal como foi constatado para a CAT e GPx. Isto tem sido relatado por outros autores, respectivamente para a catalase (Ortiz-Ordoñez et al., 2011) e para GPx (Monteiro et al., 2006), quando peixes foram expostos à ação de agroquímicos.

Observa-se na literatura que a relação concentração-resposta associada à atividade enzimática não é estritamente satisfeita, visto que baixas concentrações de um xenobiótico podem

inibir uma enzima antioxidante, enquanto concentrações maiores podem não alterá-la (Otitoju e Onwurah, 2005). Este fenômeno explicaria a inibição da atividade da GPx após o 7º dia de detoxificação onde os baixos teores de herbicidas nos tecidos seriam favoráveis para manifestar tal efeito. Similarmente aos resultados do presente trabalho, a inibição da atividade de uma enzima antioxidante (tioredoxina redutase) em peixes durante a fase de depuração de um agente tóxico também foi observada por Branco et al. (2011).



**Figura 2.** Atividade da SOD ( $U\ mg\ prote\acute{a}na^{-1}$ ) em tilápias expostas à mistura de diurom+hexazinona+tebutiuram em duas concentrações subletais durante 14 dias, seguido da fase de depuração. Os valores se referem às médias  $\pm$  erro-padrão.

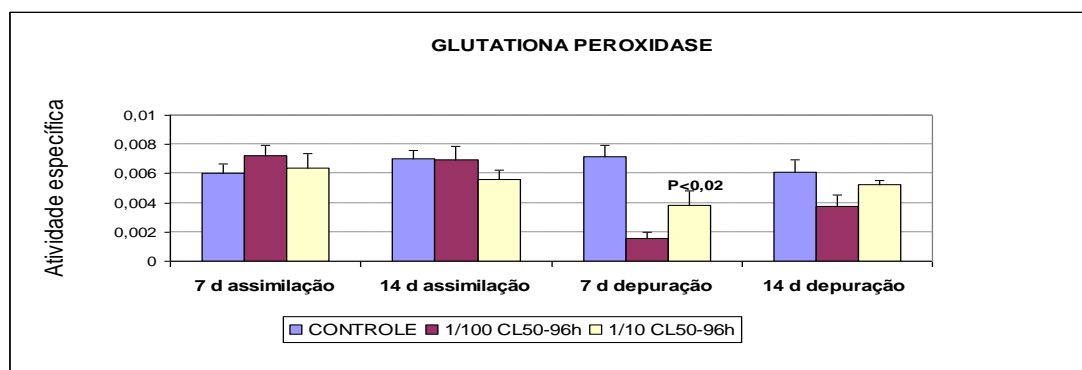


**Figura 3.** Atividade da GST ( $\mu mol\ CDNB\ conjugado\ min^{-1}\ mg\ prote\acute{a}na^{-1}$ ) em tilápias expostas à mistura de diurom+hexazinona+tebutiuram em duas concentrações subletais durante 14 dias, seguido da fase de depuração. Os valores se referem às médias  $\pm$  erro-padrão. Valores “p” calculados em relação ao controle do mesmo período.

Uma outra hipótese para a diminuição da atividade da GPx na fase de depuração seria a geração de metabólitos com efeito sobre essa enzima.



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013  
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo



**Figura 4.** Atividade da GPx ( $\mu\text{mol } \beta\text{-NADPH consumido min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$ ) em tilápias expostas à mistura de diurom+hexazinona+tebutiurum em duas concentrações subletais durante 14 dias, seguido da fase de depuração. Os valores se referem às medias  $\pm$  erro-padrão. Valor “p” calculado em relação ao controle do mesmo período.

Alterações fisiológicas e bioquímicas em organismos aquáticos em níveis de até 1/100 da CL50 têm sido relatadas para outros herbicidas (Saka et al., 2013), e também para fungicidas (Sancho et al., 2009).

#### 4 CONCLUSÃO

As enzimas CAT e GST apresentaram uma moderada evidência quanto a propriedades como biomarcadoras de exposição à mistura dos herbicidas, pois foram afetadas durante a fase de assimilação ou ao término desta.

A atividade da enzima GPx foi significativamente alterada, porém durante a fase de detoxificação.

Concentrações bem menores que as que provocam efeitos agudos da mistura de herbicida nas tilápias podem exercer mudanças no metabolismo pela alteração da atividade de enzimas antioxidantes e indução de mecanismos de detoxificação. A menor concentração testada está próxima da resultante da aplicação direta da mistura, na sua taxa de aplicação usada, sobre uma lâmina de água de 30 cm. Este dado auxilia no estabelecimento de limites máximos permissíveis.

#### 5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao *CNPq* pelo apoio mediante bolsa PIBIC concedida à primeira autora. Agradecem também à Fapesp e à Embrapa Meio Ambiente pelo suporte financeiro e pela infra-estrutura fornecida.



## VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013

13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

### 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Branco, V.; Canário, J. ; Holmgren, A. e Carvalho, C. Inhibition of the thioredoxin system in the brain and liver of zebra-seabreams exposed to waterborne methylmercury. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 251 p. 95–103, 2011.

Catalgol, B.K e Ozden, S.; Alpertunga, B. Effects of trichlorfon on malondialdehyde and antioxidant system in human erythrocytes. **Toxicology in Vitro**. v.21, p.1538–1544, 2007.

Clemente, Z; Castro, V.L.; Feitosa, L.O.; Lima, R.; Jonsson, C.M.; Maia, A.H.N. e Fraceto, L.F.. Fish exposure to nano-TiO<sub>2</sub> under different experimental conditions: Methodological aspects for nanoecotoxicology investigations. **Science of the Total Environment**, v.463–464, p. 647–656, 2013.

Santos, V.B.; de Freitas, T. F. R.; Logato, P. V. R. ; Freato, T. A.; Orfão, L. H. e Millioti, L. C.; Rendimento do processamento de linhagens de tilápias (*Oreochromis niloticus*) em função do peso corporal. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 2, p. 554-562, 2007.

Manugistics **Statgraphics Plus**: version 5.1 for Windows. Rockville, 2001

Monteiro, D. A. ;Almeida, J. A.; Rantin, F. T. e Kalinin, A. L. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v.143, p.141–149, 2006.

Moura, M. A. M.; Pelegrini, M. D. B; Soares, C. D.; Silva, D. F. P. da; Guimarães, M. e Jonsson, C. M. **Study on the joint action of herbicides Tebuthiuron, Diuron and Hexazinone to tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ECOTOXICOLOGIA, 12., 2012, Porto de Galinhas. Anais... Porto de Galinhas: Sociedade Brasileira de Ecotoxicologia, 2012. p. 237.

Ortiz-Ordoñez, E.; Uria-Galicia, E.; Ruiz-Picos R. A.; Duran A. G. S.; Trejo Y. H.; Seden-Diaz J. E. e Lopez-Lopez E.. Effect of Yerbimat herbicide on lipid peroxidation, catalase activity, and histological damage in gills and liver of the freshwater fish *Goodea atripinnis*. **Archives Environmental Contamination and Toxicology**, v. 61, p.443–452, 2011.

Ototoju, O. e Onwurah I. N. E. Superoxide dismutase (SOD) activity and serum calcium level in rats exposed to a locally produced insecticide “Rambo Insect Powder”. **Animal Research International**, v. 2, n. 1, p. 261–266, 2005.

Saka, M.; Tada, N. e Kamata, Y. Application of an amphibian (*Silurana tropicalis*) metamorphosis assay to the testing of the chronic toxicity of three rice paddies herbicides: Simetryn, mefenacet, and thioencar. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.92, p.135–143, 2013.

Sancho, E.; Fernández-Vega, C. e Villarroel, M. J.; Andreu-Moliner, E. e Ferrando M. D. Physiological effects of tricyclazole on zebrafish (*Danio rerio*) and post-exposure recovery. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C** v.150, p. 25–32, 2009.





**VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013**  
**13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo**