

Darlene Denise Dantzger

“Avaliação da Toxicidade do Diflubenzuron e p-cloroanilina em Indicadores Bioquímicos de Organismos Não-alvo Aquáticos”

Campinas
2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

Darlene Denise Dantzger

**“Avaliação da Toxicidade do Diflubenzuron e p-cloroanilina em
indicadores bioquímicos de organismos não-alvo aquáticos”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Darlene Denise Dantzger
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Hiroshi Aoyama

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestra em Biologia Funcional e
Molecular, na área de Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Hiroshi Aoyama

CAMPINAS

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

D236a Dantzger, Darlene Denise, 1980-
Avaliação da toxicidade do diflubenzuron e p-
cloroanilina em indicadores bioquímicos de organismos
não-alvo aquáticos / Darlene Denise Dantzger. –
Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Hiroshi Aoyama.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Diflubenzuron. 2. p-cloroanilina. 3. *Daphnia*
similis. 4. *Selenastrum capricornutum*. 5. *Oreochromis*
niloticus. I. Aoyama, Hiroshi, 1943-. II. Universidade
Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Analysis of the toxicity of diflubenzuron and p-chloroaniline in biochemical indicators of non-target aquatic organisms

Palavras-chave em Inglês: Diflubenzuron
p-chloroaniline
Daphnia similis

Selenastrum capricornutum
Oreochromis niloticus

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Mestra em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Hiroshi Aoyama [Orientador]
Vera Lucia Scherholz Salgado de Castro
Cláudio Martín Jonsson

Data da defesa: 13-03-2013

Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 13 de março de 2013

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Hiroshi Aoyama (Orientador)


Assinatura

Dra. Vera Lucia Scherholz Salgado de Castro


Assinatura

Dr. Claudio Martin Jonsson


Assinatura

Dra. Cíntia Maria Saia Cereda

Assinatura

Dra. Willian Fernando Zambuzzi

Assinatura

Dedicatória

Sem o apoio, companhia e ajuda de meu marido Luciano, esta pesquisa teria sido muito mais difícil.

Sem a alegria e momentos de distração junto aos meus irmãos, Arthur e Natália, não teria a vontade de acordar todas as manhãs para trabalhar.

Sem a ajuda intelectual da minha irmã Miriam Dantzger, este trabalho teria sido só mais um trabalho qualquer.

Nem gosto de imaginar se meus pais, Dalziro e Raquel, não existissem na minha vida, sempre ao meu lado.

Por isso, dedico este trabalho a estas pessoas imprescindíveis na minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre estar a frente de todos os meus planos, pela minha saúde e por sempre cuidar de mim.

Ao meu orientador, professor Dr. Hiroshi Aoyama, todo o meu respeito, admiração e gratidão por me acolher em seu laboratório, me ensinar com maestria a enzimologia, depositar em mim a sua confiança e sempre me incentivar a cada obstáculo por mim encontrado.

À minha irmã e mestra, Miriam Dantzger, por ter me apresentado ao professor Hiroshi, me ensinado a bioquímica e me ajudado muito na realização deste trabalho.

À Professora Dra. Eneida de Paula pelas suas maravilhosas aulas de bioquímicas que me ajudaram a entrar no programa de pós graduação em Biologia Funcional e Molecular do Instituto de Bioquímica.

Ao meu co-orientador Dr. Claudio M. Jonsson, pela amizade e principalmente por me orientar efetivamente na execução deste trabalho.

À Dr. Vera S. S. Castro, pelos seus ensinamentos de ecotoxicologia, pela amizade que cultivo desde meu primeiro estágio e pelas valiosas orientações na execução deste trabalho.

À Professora Dra. Carmen V. Ferreira pelas dicas sugeridas para o melhoramento deste trabalho e por estar sempre disposta a me ajudar.

À amiga Ms. Zaíra pelos momentos de “Help” e pela imensa ajuda na execução dos experimentos.

À amiga e companheira de trabalho, Dra. Camila Camargo, pelos momentos de distração juntas, por ter me apresentado a culinária japonesa rs...rs..., e principalmente, por me ajudar sempre.

A companheira de mestrado Camila “Vermelhinha”, por tudo de bom e ruim que passamos juntas durante o nosso mestrado.

À técnica do Laboratório de Enzimologia, Erika, pela convivência diária, amizade e auxílio durante os experimentos.

À jovem cientista Thais, que me distraiu várias vezes durante meus experimentos rs...rs...

Agradeço especialmente a todas as amigas queridas do Laboratório de ecotoxicologia e biossegurança da Embrapa Meio Ambiente: Neusa, Mara, Dna Nenê, Eliane, Priscila, Verônica, e Flávia, por tudo que passamos juntas, amizade, pela ajuda técnica e pelo espaço e equipamentos cedidos.

Aos amigos do Laboratório de Transdução de Sinal, que me deram grandes dicas durante nossas aulas e pelos momentos de distração e coleguismo.

Agradeço à Fapesp (Processo 2011/04788-6) pelo apoio financeiro que tornou viável a execução deste trabalho

Agradeço ao pessoal do grupo de pesquisa do Laboratório de Química de Proteínas (Laquip) pela amizade, o uso de equipamentos e fornecimento de materiais.

Agradeço ao pessoal do Laboratório de Biomembranas e do Laboratório de Bioquímica do Exercício (Labex), por terem me disponibilizado a utilização de alguns equipamentos e pelo fornecimento de materiais.

Aos membros da banca de qualificação, professora Carmen Veríssima Ferreira, Dra. Cintia Cereda e Dra. Vera Lucia S. S. de Castro e da banca de examinadores da dissertação.

A todos os professores do programa de pós-graduação em Biologia Funcional e Molecular, por colaborarem com meu crescimento profissional e intelectual.

Aos funcionários da Secretaria de Pós Graduação em Biologia Funcional e Molecular, especialmente à Andréia pela dedicação, eficiência e disponibilidade.

Por fim, quero agradecer a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram com a realização deste trabalho que foi na verdade a realização de um sonho.

SUMÁRIO

1	– INTRODUÇÃO	1
1.1	DIFLUBENZURON (DFB) E SEU METABÓLITO P-CLOROANILINA (PCA).....	3
1.2	ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS E INDICADORES BIOQUÍMICOS.....	5
1.3	ORGANISMOS-TESTE	7
1.3.1	<i>Pseudokirchneriella subcapitata (algas)</i>	8
1.3.2	<i>Daphnia similis (microcrustáceos)</i>	9
1.3.3	<i>Oreochromis niloticus (peixes)</i>	10
1.4	FOSFATASES	11
1.4.1	<i>Fosfatases de Algas</i>	13
1.4.2	<i>Fosfatases de Daphnias</i>	14
1.4.3	<i>Fosfatases de Peixes</i>	14
1.5	CATALASE E SUPERÓXIDO DISMUTASE	15
1.6	ESTUDOS IN VIVO	17
1.7	ESTUDOS IN VITRO	17
2	– OBJETIVOS.....	19
3	– MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1	COMPOSTOS AVALIADOS	21
3.2	OBTENÇÃO E CONDIÇÕES DE CULTIVO DE ALGAS	21
3.3	OBTENÇÃO E CONDIÇÕES DE CULTIVO DE DAPHNIAS	22
3.4	OBTENÇÃO E CONDIÇÕES DE CULTIVO DE PEIXES	22
3.5	TESTES DE TOXICIDADE AGUDA PARA OBTENÇÃO DA CONCENTRAÇÃO EFETIVA MEDIA (CE50).....	23
3.5.1	<i>Teste de toxicidade em Algas</i>	23
3.5.2	<i>Teste de toxicidade em Daphnias</i>	24
3.5.3	<i>Teste de toxicidade em Peixes</i>	25
3.6	ESTUDOS IN VIVO	27
3.6.1	<i>Tratamento das algas e processamento das amostras</i>	27
3.6.2	<i>Tratamento das daphnias e processamento das amostras</i>	28
3.6.3	<i>Tratamento dos Peixes e processamento das amostras</i>	29

3.6.4	<i>Análises enzimáticas</i>	32
3.6.4.1	Fosfatase ácida (FAT)	32
3.6.4.2	Fosfatase alcalina (Falc)	32
3.6.4.3	Catalase (CAT)	32
3.6.4.4	Superóxido dismutase (SOD)	32
3.6.5	<i>Quantificação de proteína</i>	33
3.7	ESTUDOS IN VITRO	33
3.7.1	<i>Constante de Michaelis-Mentem (Km) e velocidade máxima (Vmax)</i>	34
3.7.2	<i>Concentração de inibição média (CI50) e constante de inibição (Ki)</i>	34
3.8	ANÁLISE DOS RESULTADOS	34
4	– RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1	TESTES DE TOXICIDADE AGUDA	35
4.2	ESTUDOS IN VIVO	39
4.2.1	<i>Análises enzimáticas das algas expostas ao DFB</i>	39
4.2.2	<i>Análises enzimáticas das algas expostas ao PCA</i>	41
4.2.3	<i>Análises enzimáticas das daphnias expostas ao DFB</i>	44
4.2.4	<i>Análises enzimáticas das daphnias expostas ao PCA</i>	45
4.2.5	<i>Análises enzimáticas dos fígados dos peixes expostos ao DFB</i>	48
4.2.6	<i>Análises enzimáticas dos fígados dos peixes expostos ao PCA</i>	50
4.2.7	<i>Considerações sobre alterações enzimáticas causadas aos organismos- teste pelo DFB e PCA</i>	53
4.3	ESTUDOS IN VITRO	55
4.3.1	<i>Efeito in vitro dos compostos DFB e PCA sobre a atividade das enzimas FAT, Falc, CAT e SOD das amostras de fígado dos peixes</i>	55
4.3.2	<i>Determinação da CI50 e das constantes cinéticas para as enzimas FAT e Falc de fígado de peixe sob a ação do PCA</i>	58
5	– CONCLUSÕES	65
6	- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
7	– ANEXOS	85
7.1	ANEXO 1. PROTOCOLO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO ANIMAL	85

7.2	ANEXO 2. PREPARO DO MEIO DE CULTURA DE ALGAS PSEUDOKIRCHNERIELLA SUBCAPITATA (OECD, 1984) PARA SE UTILIZAR COMO ALIMENTO PARA DAPHNIAS (DAPHNIA SIMILIS).....	86
7.3	ANEXO 3. REPICAGEM DAS ALGAS PSEUDOKIRCHNERIELLA SUBCAPITATA.....	87
8	- APÊNDICES	89
8.1	APÊNDICE 1. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA DE CULTIVO DE DAPHNIAS ANTES E APÓS O TESTE DE TOXICIDADE AGUDA COM OS COMPOSTOS DFB E PCA.....	89
8.2	APÊNDICE 2. ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA COM DICROMATO DE POTÁSSIO PARA DAPHNIA SIMILIS.....	89
8.3	APÊNDICE 3. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA DE CULTIVO DE PEIXES ANTES E APÓS O TESTE DE TOXICIDADE AGUDA COM OS COMPOSTOS DFB E PCA.	90
8.4	APÊNDICE 4. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA DE CULTIVO DE DAPHNIAS ANTES E APÓS O TESTE BIOQUÍMICO COM OS COMPOSTOS DFB E PCA.	90
8.5	APÊNDICE 5. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA DE CULTIVO DE PEIXES ANTES E APÓS O TESTE BIOQUÍMICO COM OS COMPOSTOS DFB E PCA.....	91
8.6	APÊNDICE 6. ATIVIDADE DAS ENZIMAS FAT, FALC, CAT E SOD DOS ORGANISMOS SOB O EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE DFB E PCA <i>IN VITRO</i>	92

ABREVIATURAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
APHA	Associação Americana de Saúde Pública
ASTM	Sociedade Americana de testes e materiais
CAT	Catalase
CE50	Concentração efetiva média
CETESB	Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental
CI50	Concentração de inibição média
CL50	Concentração letal a 50% dos organismos
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DFB	Diflubenzuron
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EROS	Espécies reativas de oxigênio
Falc	Fosfatase alcalina
FAT	Fosfatase ácida total
GPx	Glutathione peroxidase
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente
Ki	Constante de inibição enzimática
Km	Constante de Michaelis-Menten
LAS	Alquil benzeno sulfonato linear
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
OD	Oxigênio dissolvido
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
PCA	p-cloroanilina
Pi	Fosfato inorgânico
pNP	p-nitrofenol
pNPP	p-nitrofenilfosfato
SOD	Superóxido dismutase
USEPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
USOD	Unidade de Superóxido dismutase
Vmax	Velocidade Máxima
XO	Xantina Oxidase

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estrutura química do Diflubenzuron (FAO, 2004).....	3
Figura 2. Estrutura química da p-cloroanilina (World Health Organization, 2003).....	4
Figura 3. <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> vista no microscópio (Jonsson, 2005).....	8
Figura 4. Microcrustáceo <i>Daphnia similis</i> vista no microscópio (Dantzger, 2010).....	10
Figura 5. Tilápia do nilo, <i>Oreochromis niloticus</i> , (Ostrensky, 2008).....	11
Figura 6. Determinação da CL50-96h para algas.....	24
Figura 7. Teste de toxicidade aguda com os microcrustáceos para obtenção da CE50-48h.	25
Figura 8. Aclimação dos peixes para a realização do teste de toxicidade aguda para obtenção da CL50-96h.....	26
Figura 9. Teste toxicidade aguda para peixes para obtenção da CL50-96h.	27
Figura 10. Exposição das daphnias aos compostos DFB e PCA para realização das análises enzimáticas.	29
Figura 11. Peixes e condições experimentais para os testes bioquímicos.....	31
Figura 12. Efeito do DFB na atividade das FAT e Falc de algas.	40
Figura 13. Efeito do DFB na atividade das CAT e SOD de algas.....	41
Figura 14. Efeito do PCA na atividade das FAT e Falc de algas.....	42
Figura 15. Efeito do PCA na atividade das CAT e SOD de algas.....	42
Figura 16. Efeito do DFB sobre a atividade das FAT e Falc de daphnias.	44
Figura 17. Efeito do DFB sobre a atividade das CAT e SOD de daphnias.....	45
Figura 18. Efeito do PCA sobre a atividade das FAT e Falc de daphnias.	46
Figura 19. Efeito do PCA sobre a atividade das CAT e SOD de daphnias.....	47
Figura 20. Efeito do DFB sobre a atividade das FAT e Falc do fígado dos peixes.....	49
Figura 21. Efeito do DFB sobre a atividade das CAT e SOD do fígado dos peixes.	50
Figura 22. Efeito do PCA sobre a atividade das FAT e Falc do fígado dos peixes.....	51
Figura 23. Efeito do PCA sobre a atividade das CAT e SOD do fígado dos peixes.	51
Figura 24. Alterações significativas na atividade das enzimas FAT, Falc, CAT e SOD de daphnias, algas e peixes expostos <i>in vivo</i> ao DFB.	53

Figura 25. Alterações significativas na atividade das enzimas FAT, Falc, CAT e SOD de daphnias, algas e peixes expostos <i>in vivo</i> ao PCA.	54
Figura 26. Efeito da concentração do PCA sobre a atividade da enzima FAT do fígado dos peixes.	60
Figura 27. Efeito da concentração do PCA sobre a atividade da enzima CAT do fígado dos peixes.	61
Figura 28. Determinação de Km, Ki e Vmax da fosfatase ácida do fígado de peixes através do gráfico de Michaelis-Menten.	62
Figura 29. Determinação de Km, Ki e Vmax da fosfatase ácida do fígado de peixes através do gráfico de Lineweaver-Burk.	63
Figura 30. Determinação de Km, Ki e Vmax da Catalase do fígado de peixes através do gráfico de Michaelis-Menten.....	63
Figura 31. Determinação de Km, Ki e Vmax da Catalase do fígado de peixes através do gráfico de Lineweaver-Burk.....	64

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Concentrações finais de DFB e PCA que foram testadas para obtenção da CE50	23
Tabela 2. Toxicidade do DFB para os organismos-teste	35
Tabela 3. Toxicidade do PCA para os organismos-teste	38
Tabela 4. Toxicidade do PCA para diversas espécies de peixes.....	39
Tabela 5. Alteração da atividade de enzimas de algas pela ação de poluentes de origem agrícola.....	43
Tabela 6. Efeito <i>in vitro</i> dos compostos DFB e PCA sobre a atividade das enzimas FAT, Falc, CAT e SOD dos organismos-teste.....	56
Tabela 7. Atividade das enzimas FAT e CAT do fígado dos peixes, na presença de diferentes concentrações de PCA.	57

RESUMO

O uso de produtos agrícolas vem sendo a principal forma de combater parasitas na aquicultura, sendo que o Diflubenzuron, (DFB) é o mais utilizado. Este composto inibe a síntese de quitina, componente do exoesqueleto dos parasitas, e apresenta baixa toxicidade aos peixes. Porém, no ambiente aquático, o DFB pode ser tóxico às espécies não-alvo e, quando degradado, gera p-cloroanilina, (PCA), metabólito potencialmente cancerígeno e mutagênico para o ser humano. Tendo em vista a necessidade de se obter mais informações sobre a toxicidade destes compostos nos organismos aquáticos não-alvo, a proposta deste trabalho foi analisar a atividade enzimática de fosfatases ácida (FAT) e alcalina (Falc), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) de microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*, microcrustáceo *Daphnia similis* e o peixe *Oreochromis niloticus* com base na concentração efetiva 50% (CE50) para os testes *in vivo*, e na concentração de inibição 50% (CI50) para os testes *in vitro*, do DFB e de seu metabólito PCA. Como resultado do teste de toxicidade aguda a CE50 do DFB foi 0,00096 mg.L⁻¹, 0,009 mg.L⁻¹ e >100 mg.L⁻¹ para algas, daphnias e peixes respectivamente. A CE50 do PCA para as daphnias e os peixes foi de 0,27 mg.L⁻¹ e 24 mg.L⁻¹, respectivamente. Por sua vez, as algas não sofreram alteração no seu crescimento durante a exposição ao PCA. Nos testes bioquímicos *in vivo* o DFB e o PCA provocaram alterações na atividade das enzimas fosfatases ácida, alcalina, catalase e superóxido dismutase dos organismos-teste. Assim, as enzimas estudadas mostraram-se sensíveis à exposição aos compostos nos estudos *in vivo* podendo ser utilizadas como indicadores de poluição dos recursos hídricos por DFB e PCA. Nos ensaios *in vitro* onde as enzimas foram incubadas com os compostos DFB e PCA em diferentes concentrações, apenas as FAT e CAT do fígado dos peixes sofreram diminuição da sua atividade mediante a exposição a diferentes concentrações de PCA, e foram, portanto, utilizadas para a determinação das constantes cinéticas: Michaelis-Mentem (Km), inibição (Ki), e da velocidade máxima (Vmax), e concentração de inibição média (CI50). A FAT sofreu uma inibição do tipo competitiva (Ki 8,2 mM - Km 0,21 mM - Vmax 0,01211 e CI50 3,2 mM), já a CAT apresentou uma inibição não competitiva (Ki 0,030 mM - Km 56,3 mM - Vmax 0,001198 e CI50 0,20 mM) conforme foi aumentando a concentração de PCA. O teste *in vitro* foi importante, pois permitiu

elucidar o mecanismo de ação do PCA sobre as enzimas FAT e CAT dos peixes. Os resultados desta pesquisa mostraram que ambos os compostos foram tóxicos aos organismos-teste e causaram alterações significativas nos biomarcadores avaliados. Portanto, a utilização do DFB deve ser realizada de forma criteriosa.

ABSTRACT

The use of agricultural products has been the main way to combat parasites in aquaculture, and the diflubenzuron (DFB) is the most used for that. This compound inhibits the chitin synthesis of the parasites exoskeleton, and has low toxicity to fishes. However, in the aquatic environment, the DFB can be toxic to non-target species and, when degraded, generate p-chloroaniline (PCA), a metabolite potentially carcinogenic and mutagenic to humans. According to requirement for more information about the toxicity of these compounds on aquatic organisms, the purpose of this study was to analyze the enzymatic activity of acid and alkaline phosphatases, catalase and superoxide dismutase for microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*, microcrustacean *Daphnia similis* and fish *Oreochromis niloticus* based on 50% effective concentration (EC50) for in vivo tests, and 50% inhibiting concentration (IC50) for in vitro tests, for the DFB and its metabolite PCA. The DFB EC50 was 0.00096 mg.L⁻¹, 0.009 mg.L⁻¹ and > 100 mg L⁻¹ for algae, daphnia and fish in acute test. The PCA EC50 for daphnia and fish was 0.27 mg.L⁻¹ and 24 mg.L⁻¹, respectively. In turn, the algae had no change in their growth during exposure to PCA. In biochemical in vivo assays the DFB and PCA caused alterations in the activities of acid and alkaline phosphatases, catalase and superoxide dismutase for test organisms. Thus, the enzymes studied were sensitive to the exposure of these compounds in vivo studies and may be used as biomarkers of water pollution resources by DFB and PCA. On the in vitro test, the enzymes were incubated with the compounds DFB and PCA at different concentrations, only the FAT and CAT of fish liver had decreased activity with exposure to different concentrations of PCA, therefore, were used for determination of kinetic constants Km, Ki and Vmax, and IC50. The FAT had a competitive inhibition (Ki 8,2 mM - Km 0,21 mM - Vmax 0.01211 and IC50 3.2 mM), the CAT had a non-competitive inhibition (Ki 0,030 mM – Km 56,3 - Vmax 0.001198 and IC50 0.20 mM) when the concentration of PCA was increased. The in vitro test was important because has clarified the mechanism of action of PCA on FAT and CAT fish enzymes. The results of this study showed that both compounds were toxic to test organisms and caused significant changes in biomarkers evaluated. Therefore, the use of DFB must be done carefully.

1 – INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a produção aquícola tem se desenvolvido intensamente no Brasil. Em 2004, essa produção alcançou um volume de 1.015.916 toneladas, o que representou um acréscimo de 2,6% em relação ao ano anterior. A aquicultura participou com 26,5% (269.697,50 toneladas) na produção total de alimentos oriundos dos recursos hídricos do Brasil, gerando US\$ 965.627,60. O aumento da produção aquícola tem despertado a atenção da comunidade científica e de órgãos de gestão ambiental quanto aos riscos relacionados a esta atividade. Esses riscos incluem os danos ambientais gerados pelo manejo não sustentável desta atividade (FAO, 2007).

Embora a tecnologia de produção de peixes tenha evoluído muito nestes últimos anos, a sobrevivência destes organismos é baixa devido aos parasitos e predadores que atacam os peixes, provocando atraso em seu crescimento e altas taxas de mortalidade (Ranzani - Paiva *et al.*, 1997).

Nas informações divulgadas pela Secretaria de Defesa Animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, verifica-se que ainda não existe no país nenhum produto registrado para controle de ectoparasitos de peixes, visto que não existe legislação específica para este registro (Campos, 2005). Para o tratamento destes parasitos, é comum a utilização de formulações de uso agrícola ou veterinário, sem especificações técnicas do fabricante para uso no setor aquícola. Entre os agroquímicos utilizados na aquicultura em geral, destaca-se o Diflubenzuron, (DFB), inseticida com ação reguladora do crescimento de artrópodes e crustáceos e que quando metabolizado gera o composto p-cloroanilina (PCA) (Mabilia *et al.*, 2004). O grande problema da utilização desses produtos químicos está relacionado aos possíveis impactos negativos que podem provocar quando atingem ambientes aquáticos, espécies sensíveis e não-alvo. O ecossistema aquático é constantemente perturbado por poluentes tóxicos das mais variadas fontes. Os lixiviados de áreas agrícolas, os crescentes despejos de esgotos domésticos e industriais e a liberação dos efluentes das pisciculturas, contribuem significativamente para modificações ambientais, reduzindo a diversidade de espécies autóctones e aumentando desordenadamente a densidade de espécies indesejáveis (Zagatto e Bertoletti, 2006). A

piscicultura gera efluentes que podem conter ração não consumida, fezes e resíduos de produtos químicos os quais são utilizados na desinfecção, controles de pestes e predadores, tratamentos de doenças, hormônios para induzir a reprodução e a reversão sexual, anestésicos, dentre outros (Eler *et al.*, 2006).

Por sua vez, quando os contaminantes atingem a hidrosfera são distribuídos pela ação da água e podem ou não permanecer em solução por longos períodos de tempo. Dependendo das características físico-químicas do composto, parte dele poderá volatilizar, ou poderá ser adsorvido ao material suspenso e ao sedimento. Podem ainda ingressar nos organismos aquáticos e sofrer acúmulo nos mesmos. Segundo Boyd e Massaut (1999), são grandes os riscos associados ao uso de produtos químicos nos tanques de piscicultura, como a contaminação dos peixes comprometendo a segurança alimentar e a exposição dos trabalhadores aos produtos ao aplicá-los nos tanques.

Sendo assim, é de suma importância a validação de métodos alternativos no monitoramento de áreas degradadas que possam assegurar o desenvolvimento sustentável da aquicultura brasileira. Estes métodos podem servir para o estabelecimento de boas práticas de manejo, uma vez que parte-se do pressuposto de que grande parte dos impactos ambientais pode ser evitado ou minimizado por meio do emprego destas práticas (Queiroz & Silveira, 2006).

Outro fator importante neste contexto é a determinação dos limites toxicológicos do DFB e do PCA para espécies não-alvo. Esta determinação poderá contribuir para o aprimoramento da Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) N° 430 de 13/05/11. Isto porque esta resolução não apresenta limites para muitos compostos agrícolas em uso, como é o caso do DFB (Brasil, 2011). Além disso, são escassos na literatura dados toxicológicos sobre o DFB e PCA para organismos aquáticos. Portanto, há a necessidade de se gerar dados que auxiliem no estabelecimento de níveis máximos permissíveis destes compostos em corpos de água.

A seguir serão apresentados dados sobre os compostos DFB e PCA, questões relativas à utilização de ensaios ecotoxicológicos e de indicadores bioquímicos para a avaliação da toxicidade dos compostos DFB e PCA, dados sobre as enzimas fosfatases ácida e alcalina, catalase, superóxido dismutase, os organismos-teste e a metodologia

empregada para verificação da toxicidade destes compostos sobre os organismos não-alvo.

1.1 Diflubenzuron (DFB) e seu metabólito p-cloroanilina (PCA)

O DFB é uma benzofeniluréia, com fórmula estrutural apresentada na Figura 1, utilizada para o controle de insetos atuando como inibidor na formação do exoesqueleto de quitina (FAO, 2007).

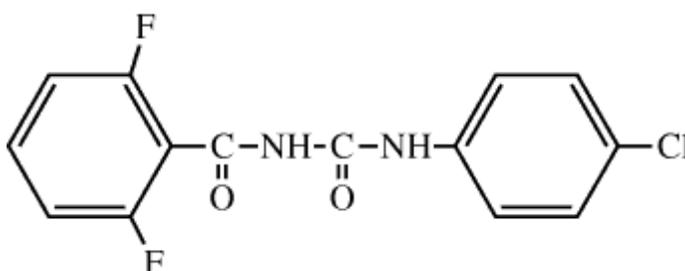


Figura 1. Estrutura química do Diflubenzuron (FAO, 2004).

O DFB é aplicado em culturas de milho, tomate, algodão, trigo e citros contra larvas de *Lepidoptera*, *Coleoptera*, *Diptera* e *Hymenoptera* (USEPA, 1997), mas vem sendo utilizado sem registro nas pisciculturas brasileiras por apresentar resultados satisfatórios no controle de ectoparasitoses, como a *Lernaea cyprinacea* e *Dolops carvalhoi*, e possuir baixa toxicidade aos peixes (Burka *et al.*, 1997). Entretanto, apesar desta baixa toxicidade, o inseticida pode apresentar efeitos subletais nos mesmos. Tanner e Moffet (1995) constataram redução de 97% na taxa de crescimento das larvas dos peixes *Lepomis macrochirus* expostas a 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de DFB. Mesmo em concentrações mais baixas do inseticida (2,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$), constataram 86% de redução no crescimento das larvas destes peixes. Draredja e Soltani (2001) observaram que o DFB provocou atraso no crescimento do peixe mosquito (*Gambusia affinis*), exposto por 24 horas à concentração de 78 ng.L^{-1} .

O DFB é frequentemente usado em piscicultura com eficácia nas concentrações que variam entre 0,5 a 2 mg.L^{-1} . Porém, alguns trabalhos ressaltam que tais doses podem ser letais para populações zooplanctônicas, principalmente aquelas que apresentam exoesqueleto quitinoso, como as de invertebrados de água doce,

crustáceos marinhos e estuarinos (Schalch, *et al.*, 2005). Diversos estudos avaliaram a resposta de espécies zooplanctônicas ao tratamento com DFB e constataram que populações de *cladóceros* e *copépodas* podem ser totalmente eliminadas por extensos períodos de exposição a concentrações superiores a $7 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Fischer e Hall, 1992).

Estudos de toxicidade com DFB para diferentes espécies de peixes indicam que um dos seus metabólitos, a p-cloroanilina, (PCA), apresenta elevada toxicidade para estes organismos, sendo maior que a do próprio produto de origem. A PCA, (Figura 2), encontra-se na lista de produtos químicos perigosos da Companhia de Tecnologia de Saneamento Básico de São Paulo CETESB (2007) e esta substância foi classificada como mutagênica e provavelmente carcinogênica aos humanos pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA, USEPA (1997).

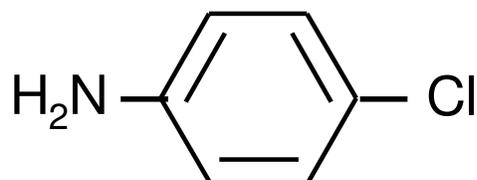


Figura 2. Estrutura química da p-cloroanilina (World Health Organization, 2003).

Os compostos cloroanilina além de serem derivados de agroquímicos também são compostos ligados à atividade industrial, como intermediários na produção de borrachas, plásticos, espuma de poliuretano, pigmentos e produtos farmacêuticos. A PCA foi identificada como produto de degradação de pesticidas dos grupos fenil uréia e fenil carbamatos (Kataoka, 1996). Devido a sua importância toxicológica, a PCA e outras aminas substituídas foram incluídas pela Comunidade Européia na lista de poluentes industriais que devem ser monitorados em águas ambientais (Coquart e Hennion, 1993).

Diante do exposto, são necessários estudos que considerem os efeitos tóxicos que estes produtos são capazes de oferecer aos organismos zooplanctônicos e também aos demais organismos representativos da cadeia alimentar aquática.

1.2 Ensaios ecotoxicológicos e indicadores bioquímicos

Os ensaios ecotoxicológicos são fundamentais para o estudo de compostos químicos presentes na comunidade aquática, pois relacionam os efeitos tóxicos das substâncias químicas e dos agentes físicos sobre os organismos vivos incluindo os caminhos da transferência desses poluentes e sua interação com o ambiente (Truhaut, 1977).

Os testes toxicológicos são úteis por permitir o estabelecimento de limites permissíveis de substâncias químicas para proteger a vida aquática e a realização da avaliação do impacto sobre a biota dos corpos hídricos. Com estas informações é possível alertar para a necessidade da utilização de medidas preventivas, a fim de evitar a ocorrência de danos que colocam em risco a saúde ambiental e, conseqüentemente, afetam a saúde humana. Deste modo, os ensaios de ecotoxicidade são incluídos em programas de controle de poluição, sendo uma das análises indispensáveis (CETESB, 1990).

Nesta pesquisa os ensaios ecotoxicológicos com DFB e PCA visaram à obtenção de dados sobre sua toxicidade aguda. Esta é avaliada pelo efeito observado quando o organismo teste é exposto ao agente tóxico por um curto período de tempo, geralmente entre 24 e 96 horas (CETESB, 1994). Os resultados dos testes agudos são expressos em CE50, ou seja, concentração efetiva média ou concentração do composto estimada para imobilizar (CE50), inibir o crescimento (CI50) ou matar (CL50) 50% da população dos organismos testados (OECD 202, 1984).

Embora os ensaios de toxicidade aquática aguda e crônica sejam muito empregados no monitoramento ecológico, não revelam o tóxico responsável pela contaminação e também geram pouca informação sobre seu mecanismo de toxicidade (Hutchinson *et al.*, 2006).

Alterações ao nível bioquímico ou molecular são normalmente as primeiras respostas detectáveis e quantificáveis em uma mudança do meio ambiente. Variações nos sistemas bioquímicos são freqüentemente indicadores mais sensíveis que os de maiores níveis de organização biológica, tais como células, organismos e populações (Stegeman *et al.*, 1992). Essas alterações normalmente exibem um tempo de exposição mais curto do que os indicadores de níveis de organização mais elevados como tecidos

e sistêmicos, por exemplo. Por causa destas características, os indicadores bioquímicos são apontados como sistemas de “sinal de alerta” na avaliação da saúde ambiental (Diamantino *et al.*, 2000).

Para a verificação de contaminação dos corpos hídricos por compostos químicos, como o DFB e PCA, a utilização de indicadores bioquímicos pode ser mais vantajosa economicamente quando comparado à implementação de protocolos de análise que utilizam métodos de alto custo e que demandam maior tempo de análise (Arias *et al.*, 2007).

Alguns agentes poluentes podem se concentrar em diferentes tecidos e promover a indução ou inibição de sistemas enzimáticos responsáveis por processos vitais celulares, tais como o das fosfatases (Jonsson, 2005), enzimas de óxido-redução, acetilcolinesterase e glutathione S-transferase (Barata *et al.*, 2005). A verificação da ativação ou inibição de enzimas pode ser realizada através de protocolos de fácil e rápida análise e de baixo custo. Portanto, estas alterações bioquímicas, podem ser consideradas boas indicadoras para a verificação de áreas contaminadas (Allan *et al.* 2006).

Além disso, o interesse no uso de indicadores bioquímicos para análise de risco ambiental tem aumentando constantemente (Adams, 2002). Allan *et al.* (2006) propôs no European Water Directors a utilização destes no monitoramento da qualidade da água para prever uma análise mais precisa do impacto dos contaminantes aos organismos aquáticos.

Para este estudo, escolheu-se trabalhar com as fosfatases ácida (FAT) e alcalina (Falc), e com duas enzimas-chave para o sistema antioxidante dos organismos, a catalase (CAT) e a superóxido dismutase (SOD), extraídas de organismos aquáticos não-alvo: a microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*, o microcrustáceo *Daphnia similis* e o peixe *Oreochromis niloticus* que, no decorrer desta tese, para que o entendimento seja facilitado, serão referidos apenas como alga, daphnia e peixe, respectivamente, focando a alteração enzimática como possível indicador de poluição hídrica pelos compostos DFB e PCA.

1.3 Organismos-teste

Os organismos recomendados para os testes toxicológicos e para os processos de classificação de risco ambiental devem ser de importância significativa na cadeia trófica. Para este estudo, escolheu-se trabalhar com a alga clorofícea unicelular da espécie *Pseudokirchneriella subcapitata*, com o microcrustáceo *Daphnia similis* e com o peixe *Oreochromis niloticus*, (Tilápia do nilo), todos comumente empregados como biomarcadores em ensaios de toxicidade e importantes representantes da cadeia alimentar aquática.

Uma variedade de protocolos, nos quais são recomendadas as espécies a serem utilizadas, tem sido desenvolvidas pela American Public Health Association (A.P.H.A.), U.S. Environmental Protection Agency (U.S.E.P.A.), American Society for Testing and Materials (A.S.T.M.) e Organization for Economic Cooperation and Development (O.E.C.D.). No Brasil, os procedimentos dos testes em organismos aquáticos estão descritos no “Manual de Testes para a Avaliação de Toxicidade de Agentes Químicos do IBAMA” (IBAMA, 1989) e em documentos da CETESB – Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental - que informam sobre as metodologias com diferentes organismos (normas técnicas L5.018, L5.019, L5.020, L5.022, L5.227 e L.5228) e sobre a aplicação dos resultados para o controle de efluentes tóxicos (Gherardi-Goldstein *et al.*, 1990; Bassoi *et al.*, 1990). Nestes procedimentos são realizados estudos com três organismos pertencentes a diferentes níveis tróficos do ambiente aquático. Assim por exemplo, com os produtores primários, representados por espécies de algas como *Chlorella vulgaris*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Ankistrodesmus sp* e *Scenedesmus sp*, com os consumidores primários como os microcrustáceos *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia s.p.*; e com os consumidores secundários representados por peixes como *Cheirodon notomelas*, *Hemigrammus marginatus*, *Poecilia reticulata* e peixes da família Characidae em geral.

Estes organismos são capazes de se adaptar às condições de laboratório, possuem ciclo de vida relativamente curto e, principalmente, possuem elevada sensibilidade a contaminantes que frequentemente atingem os ambientes aquáticos (Villarroel *et al.*, 2003).

1.3.1 *Pseudokirchneriella subcapitata* (algas)

A microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*, (anteriormente denominada como *Selenastrum capricornutum*), está entre as espécies mais recomendadas em teste de toxicidade de água-doce (Figura 3). Os ensaios de toxicidade aguda e crônica realizados com algas costumam ser mais sensíveis quando comparados aos realizados com outras espécies aquáticas, tais como peixes e crustáceos. A partir de testes de toxicidade com algas, foi sugerido que as substâncias químicas fossem classificadas quanto a sua toxicidade, auxiliando na avaliação do risco ambiental para os sistemas naturais (USEPA, 1994).

Como todas as algas do filo Chlorophyta de água doce, estes organismos possuem uma distribuição cosmopolita em solos e corpos d'água (Lee, 1989; Keddy, 1995), motivo pelo qual tem sido amplamente utilizados em estudos de ecotoxicidade de poluentes ambientais (Kasai & Hatakeyama, 1993; Kong *et al.*, 1998; Jonsson *et al.*, 1998) e recomendados no registro de agentes químicos e biopesticidas por órgãos nacionais (Gherardi-Goldstein *et al.*, 1990; IBAMA, 1988; Jonsson & Maia, 1999) e internacionais (OECD, 1981; U.S.E.P.A., 1994).

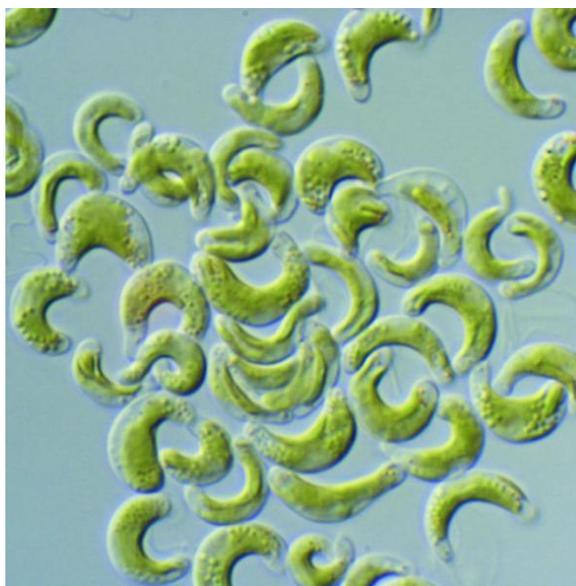


Figura 3. *Pseudokirchneriella subcapitata* vista no microscópio (Jonsson, 2005).

O uso de algas como indicador biológico é importante porque, como produtores primários, elas se situam na base da cadeia alimentar e qualquer alteração na dinâmica de suas comunidades pode afetar os níveis tróficos superiores do ecossistema. Dentre as vantagens em se utilizar algas em testes de toxicidade podemos destacar sua grande sensibilidade às alterações ocorridas no meio ambiente e o seu ciclo de vida relativamente curto, o que possibilita a observação de efeitos tóxicos em várias gerações (Kong *et al.*, 1998).

1.3.2 *Daphnia similis* (microcrustáceos)

Os microcrustáceos da ordem Cladópera e do gênero *Daphnia* (Figura 4), os quais são vulgarmente conhecidos como pulgas d'água, são bastante utilizados em testes de toxicidade. Estes são amplamente distribuídos nos corpos d'água doce e importantes em muitas cadeias alimentares, pois são fonte significativa de alimento para peixes e outros organismos. As daphnias possuem um ciclo de vida relativamente curto, são facilmente cultivadas em laboratório e sensíveis a vários contaminantes do ambiente aquático. Uma das vantagens de se utilizar estes organismos em testes toxicológicos é que devido ao seu pequeno tamanho, cerca de 0,5 a 5 mm de comprimento, necessitam de menores volumes de amostras-teste e água de diluição do que os testes realizados com algas e peixes (Brooks, 1959). Além disso, a reprodução assexuada desses crustáceos por partenogênese garante a produção de organismos geneticamente idênticos permitindo, assim, a obtenção de organismos-teste com sensibilidade constante (Rocha & Güntzel, 1999).

Várias espécies de *Daphnia* são utilizadas em testes de toxicidade, mas, a mais utilizada é a *Daphnia magna*, para a qual existe um grande número de informação sobre as técnicas de cultivo, os requisitos de temperatura, luz e nutrientes e sobre sua resposta a muitas substâncias tóxicas (Ebert, 2005). As espécies de *Daphnia* são basicamente diferenciadas pelo seu tamanho e essa característica tem influência sobre a toxicidade das substâncias (Barros *et al.*, 2007).

No Brasil a *Daphnia similis* vem sendo bastante utilizada em testes de toxicidade. Apesar de não ser uma espécie nativa, é facilmente cultivada em laboratório e atende

os critérios estabelecidos pelos procedimentos padrões para a seleção de espécies alternativas (OECD, 1984; CETESB, 1994; ABNT, 2004).



Figura 4. Microcrustáceo *Daphnia similis* vista no microscópio (Dantzger, 2010).

1.3.3 *Oreochromis niloticus* (peixes)

Os peixes *Oreochromis niloticus*, conhecidos popularmente como tilápia do nilo, representantes dos consumidores secundários nas cadeias alimentares, foram introduzidas no Brasil pela Secretaria da Agricultura do estado de São Paulo, em 1952, para conter a proliferação de algas e macrófitas aquáticas em represas. Este peixe passou a ser a espécie mais cultivada no Brasil a partir do ano de 2002. Em 2004 a sua produção representou 26% do total produzido pela aquicultura nacional, sendo que o país respondeu por 64% da produção total da espécie e 67% em receitas geradas pelo cultivo da mesma na América do Sul em 2004; seguido pela Colômbia com uma produção de 26%. O cultivo da tilápia desenvolveu-se de forma bastante significativa no Brasil a partir de 1996, sendo que, em 2004 registrou-se um incremento na produção de 6,5% em nível nacional (Ostrensky *et al.*, 2008). A tilápia do nilo é uma espécie exótica de peixe (Figura 5) que conquistou os produtores nacionais devido a sua precocidade,

produtividade e bom valor econômico. A alta qualidade de sua carne faz dela um produto de interesse industrial e de boa aceitação pelo mercado consumidor. Atualmente é cultivada em 22 estados brasileiros e com uma produção anual de 30 a 40 mil toneladas (Ostrensky *et al.*, 2008).

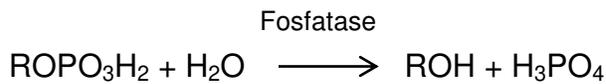
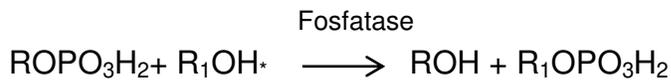


Figura 5. Tilápia do nilo, *Oreochromis niloticus*, (Ostrensky, 2008).

Os bioensaios com peixes permitem estudar, sob condições controladas, algumas variáveis como mortalidade, alterações comportamentais e danos teciduais ou celulares, podendo ajudar a prever alguns efeitos de contaminantes em ecossistemas aquáticos naturais (Oliveira *et al.*, 1996). Além disso, existe extensa literatura sobre seu comportamento, fisiologia e requerimentos ambientais que os tornam relevantes como grupo de organismos-teste para avaliar os efeitos biológicos de substâncias químicas tóxicas (Rand, 2008).

1.4 Fosfatases

As fosfatases ou ortofosfato mono éster fosfohidrolases (E.C.3.1.3.2.) são enzimas que catalisam a desfosforilação de uma grande variedade de ésteres ortofosfato e reações de transfosforilação (Saeed *et al.*, 1990), como esquematizado abaixo:

HidróliseTransfosforilação

· Aceptor de fosfato

Estas hidrolases estão amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em animais (Granjeiro *et al.*, 1997, Jonsson, 2005) e vegetais (Ferreira *et al.*, 1998, Granjeiro *et al.*, 1999) e são classificadas em fosfatases ácidas (FAT) ou fosfatases alcalinas (Falc).

As fosfatases são enzimas que desempenham importantes funções metabólicas como a decomposição de fosfatos orgânicos em fosfato livre inorgânico e compostos orgânicos, o envolvimento em processos de sinalização intracelular e a disponibilidade de fosfato do meio extracelular para o intracelular (Aoyama *et al.*, 2003).

A FAT é considerada uma hidrolase lisossomal biomarcadora, devido ao fato de que em situações de estresse celular ocorre extravasamento desta enzima para fluidos intra e extracelulares, ocasionando a alteração de seus níveis, justificando a consideração como indicadora de tal estresse (Suresh *et al.*, 1993).

Nesse sentido, foram propostos biosensores à base de fosfatase ácida para quantificar concentrações da organofosforados e carbamatos (Mazzei *et al.*, 1996). A atividade desta enzima foi alterada pela exposição de tecidos de organismos aquáticos em amostras de água contaminada por misturas de agroquímicos, metais, bifenilas policloradas e hidrocarbonetos poliaromáticos (Strmac e Braunbeck, 2000).

Alguns trabalhos têm demonstrado alterações na atividade de fosfatases em organismos aquáticos pertencentes a diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar quando expostos a agrotóxicos e metais pesados.

Khangarot & Rathore (2003) observaram redução na atividade das fosfatases ácida e alcalina de *D. magna* exposta ao cobre nas concentrações de 0,05 mg.L⁻¹ e 0,1

mg.L⁻¹ por 48 horas. Jonsson & Aoyama (2007), estudando o efeito *in vitro* de poluentes na atividade de fosfatase ácida da alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, observaram alteração da atividade enzimática (50%) na presença de LAS (alquil benzenosulfonato linear) e dos metais pesados Hg²⁺, Al³⁺ e Cu²⁺, constatando também efeitos aditivos entre Hg²⁺ e Al³⁺ e antagônicos entre Hg²⁺ e LAS (alquil benzenosulfonato linear). Jonsson *et al.* (2009) observaram um mecanismo de inibição não competitivo para o Hg²⁺ e uma inibição competitiva para LAS e, *in vivo*, mostraram que a atividade específica da fosfatase ácida (FAT) da alga foi inibida durante 7 dias de tratamento com estes poluentes. Dantzger (2010) estudou o efeito de pesticidas e metais na atividade das fosfatases do microcrustáceo *Daphnia similis*, e constatou que a fosfatase ácida apresentou maior alteração em relação à fosfatase alcalina quando exposta aos poluentes *in vitro*, sendo que, dentre estes, os metais apresentaram efeitos mais significativos. Dos metais testados, Al³⁺, Se³⁺ e Mo⁶⁺, exibiram maior efeito inibitório, enquanto Cd²⁺ apresentou efeito ativador. Em relação aos ensaios *in vivo*, observou-se que a ordem de inibição da atividade da FAT de *Daphnia similis*, exposta a CL50-48h, assemelhou-se à obtida nos ensaios de toxicidade aguda (Cd²⁺ > Al³⁺ > Mo⁶⁺), sugerindo uma relação entre alteração de atividade enzimática com a toxicidade dos poluentes ao modelo biológico em estudo.

1.4.1 Fosfatases de Algas

Várias funções têm sido atribuídas as fosfatases presentes nas algas, tais como a participação em processos autofágicos digestivos e hidrólise de material fosfolipídico (Cooper *et al.* 1974); rompimento de plasmalema e absorção do flagelo durante a fertilização (Braten, 1975); reciclagem de Pi para sua reassimilação (Domozych, 1989; Kruskopf & Du Plessis, 2004); diferenciação dos esporos (Tsekos & Schnepf, 1991); transporte de substâncias através de membranas (Tornqvist, 1989) e disponibilidade de Pi a partir do meio extracelular (Sommer & Blum, 1965). Esta última função também é desempenhada pela fosfatase alcalina, cuja atividade é aumentada pela exposição das algas em um meio de cultura deficiente em Pi (Bachir & Loppes, 1997).

Em algas, as fosfatases estão localizadas em vários compartimentos celulares. Segundo Cooper *et al.* (1974), a enzima esta presente em vacúolos, dispersa no

citoplasma e em pontos de degradação focal. A enzima também foi encontrada no complexo de Golgi (Cooper *et al.* 1974; Tsekos e Schnepf, 1991), mitocôndria, membrana de tilacóides (Tornqvist, 1989) sistema de endomembrana (Domozych, 1989), membrana externa (Sommer e Blum, 1965) e corpos-PAS (Tornqvist, 1989). Segundo Tornqvist (1989), a localização da atividade fosfatásica ácida é alterada do citoplasma para a parede celular quando algas clorofíceas são expostas a íons metálicos como o Al^{3+} .

1.4.2 Fosfatases de Daphnias

A quantidade de fósforo inorgânico (Pi) disponível no ambiente aquático é frequentemente insuficiente para satisfazer as necessidades do plâncton, sendo considerado um fator limitante no crescimento desses organismos. Nesse contexto, as fosfatases possuem um papel crucial no metabolismo desses organismos aquáticos, disponibilizando o Pi a partir da hidrólise de fosfomonoésteres orgânicos. As fosfatases, produzidas por fitoplâncton, zooplâncton ou bactérias, podem ser encontradas dissolvidas na água de lagos e a atividade destas pode ser detectada principalmente em condições limitantes de Pi, sugerindo uma produção adaptativa destas enzimas (Lespilette *et al.*, 2007).

Wynne & Gophen (1981) observaram que *Daphnia magna* liberava tanto a fosfatase ácida quanto a alcalina e que estas atividades diferiam de acordo com a fonte de alimentação. Boavida & Heath (1984) investigaram se as fosfatases liberadas pela *D. magna* eram produzidas por estas ou se eram provenientes de seu alimento, a alga verde *Chlamydomonas acidophila*.

1.4.3 Fosfatases de Peixes

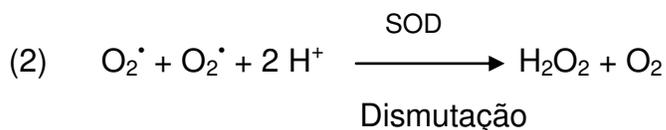
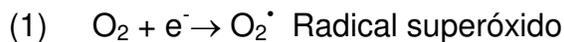
Em peixes a alteração da atividade das fosfatases em diferentes tecidos pode ser resultante de perturbações nas membranas celulares e de danos teciduais provocados por xenobióticos ou substâncias tóxicas, ou ainda de atividade osteoblástica aumentada ou obstrução intra ou extra-hepática na passagem de bile (Sancho *et al.*, 2009). Portanto, a alteração da atividade destas enzimas em peixes

pode estar relacionada com a destruição da membrana celular dos hepatócitos demonstrando dano tóxico (Galeb, 2010).

1.5 Catalase e superóxido dismutase

As enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) fazem parte dos sistemas antioxidantes nos seres vivos pela capacidade de neutralizar a ação de espécies reativas de oxigênio (EROs), como do ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) e do peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Estas moléculas, altamente reativas, fazem parte de subprodutos do metabolismo respiratório normal e desempenham papel importante nos processos de sinalização celular. Entretanto, em situações de estresse celular, as EROs podem aumentar significativamente e causar danos celulares, como alteração do DNA, peroxidação de lipídeos e oxidação de aminoácidos nas proteínas.

A enzima superóxido dismutase (SOD) dismuta o ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) formando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2), (Fridovich, 1995). A dismutação é uma reação química na qual um mesmo radical livre é oxidado e reduzido sendo muito importante para a decomposição ou consumo de radicais livres. No caso dos radicais superóxido, um transfere elétron para o outro, de forma que o radical que perdeu elétron se transforma em oxigênio molecular, e o que recebeu em peróxido de hidrogênio, conforme as equações 1 e 2:

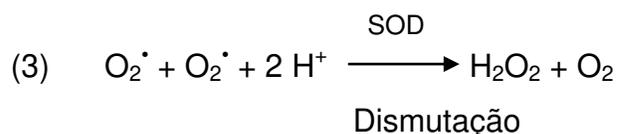


A atividade da SOD varia entre os tecidos, a mais expressiva é observada no fígado, glândula adrenal, rim e baço. Ocorre em três formas diferentes dependendo da sua localização e do metal componente em seu sítio ativo. A enzima que apresenta manganês no seu sítio ativo (Mn-SOD) é encontrada na matriz mitocondrial e elimina o superóxido formado na matriz ou no lado interno da membrana mitocondrial. Sua expressão é induzida por agentes causadores de estresse oxidativo, incluindo radiação

e hiperóxia (Pitkänen e Robinson, 1996; Das *et al.*, 1995). As enzimas que apresentam os metais cobre e zinco (Cu-Zn-SOD) no seu sítio ativo, são eminentemente encontradas no citosol, embora possam ser encontradas também em lisossomos e no espaço intermembranas mitocondrial (Mccord e Fridovich, 1988; Fridovich, 1995).

A catalase (CAT) é uma enzima antioxidante presente nos peroxissomos de quase todas as células aeróbias, protegendo estas dos efeitos deletérios do peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Os peroxissomos são organelas que possuem em seu interior enzimas oxidativas, como a catalase, a urato oxidase, a D-aminoácido oxidase e enzimas responsáveis pela β -oxidação dos ácidos graxos.

Parte do H_2O_2 , nos organismos aeróbios, é formado através da dismutação do ânion superóxido (Nelson, 2005). A catalase acelera a decomposição do peróxido de hidrogênio em O_2 e H_2O sem a produção de radicais livres, como se pode verificar através das equações 3 e 4 (Vainshtein *et al.*, 1981).



A atividade da catalase pode aumentar conforme a produção de H_2O_2 em organismos expostos a agrotóxicos. Dessa forma a avaliação de sua atividade pode ser realizada através de métodos fáceis, validados e de baixo custo. Por esse motivo geralmente é utilizada em estudos para verificação de estresse oxidativo (Vainshtein *et al.*, 1981).

A alteração da atividade da CAT extraída de organismos expostos a poluentes químicos de diversas origens tem sido alvo de estudo na análise de risco e monitoramento de áreas degradadas (Pandey *et al.*, 2003). Kim *et al.* (2010) verificaram, a partir de estudos com clonagem molecular, que a catalase de *Daphnia magna* podia ser eficazmente empregada como biomarcadora de estresse oxidativo para muitos poluentes aquáticos.

Yu e colaboradores, (2009) sugeriram que o estresse oxidativo está envolvido no mecanismo de toxicidade do composto 1,3-alquil-brometometilimidazólico, evidenciado pelo aumento da atividade das enzimas SOD, CAT e glutatona.

Estudos realizados por Ozcan Oru *et al.* (2004), com carpa comum (*Cyprinus carpio*) e com tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*), expostos a dois pesticidas, indicaram que os peixes desenvolveram respostas adaptativas tecido-específicas para proteger as células contra o estresse oxidativo, sendo que em brânquias houve aumento na atividade da SOD comparado ao rim e cérebro. A exposição individual e combinada aos pesticidas causaram elevação na atividade da CAT e na glutatona peroxidase (GPx) das carpas. Estas enzimas podem constituir um bom biomarcador molecular de estresse oxidativo e também podem indicar a magnitude de respostas em populações cronicamente expostas aos poluentes, tais como, metais pesados e outros xenobióticos (Zhang *et al.*, 2004).

1.6 Estudos *in vivo*

São realizados através da medida da atividade da enzima, a qual foi extraída de um organismo-teste submetido ao agente tóxico sob um dado período de tempo. Estes testes tem sido realizados pela exposição de organismos às concentrações conhecidas do poluente, em condições laboratoriais (Jonsson *et al.* 2002) ou de campo (Maycock *et al.*, 2003), para a avaliação de risco. Portanto, os dados dose-resposta obtidos auxiliam o estabelecimento de níveis aceitáveis de concentração no compartimento aquático.

A utilização de estudos da alteração da atividade enzimática pela exposição *in vivo* na avaliação de áreas impactadas e seu monitoramento tem sido extensamente abordada pela literatura, tanto para poluentes orgânicos (Balint *et al.*, 1997), como para metais (El Demerdash, 1999).

1.7 Estudos *in vitro*

Estes estudos são realizados pela adição do poluente num sistema de reação contendo o substrato juntamente com a enzima, extraída de uma célula ou tecido supostamente não exposto à ação do contaminante.

Os estudos de avaliação da atividade enzimática *in vitro* representam uma ferramenta útil na triagem de vários agentes poluentes e tem sido usados em áreas de monitoramento (Repetto *et al.*, 2000), como métodos de análise qualitativa e quantitativa de poluentes orgânicos e metais pesados (Gill *et al.*, 1990). Neste sentido, tem se demonstrado que a medida da atividade enzimática pode ser usada como um bioindicador de toxicidade de poluentes, pois consome menor tempo de análise, requer menor esforço humano e alguns efeitos qualitativos tendem a ser semelhantes aos que ocorrem nos organismos vivos (El Demerdash & Elagamy, 1999).

Os resultados obtidos em testes *in vitro* podem proporcionar informações úteis para a elucidação do mecanismo de ação tóxica sobre uma determinada espécie de organismo, além de nos permitir fazer comparações sobre a susceptibilidade de uma enzima para diferentes poluentes (Elsebae, 1996; Jin-Clark *et al.*, 2002) ou ainda, sobre a susceptibilidade de diferentes enzimas para um dado poluente (Gill *et al.*, 1992). Para isto, obtém-se parâmetros de ativação ou inibição enzimática (El Demerdash & Elagamy, 1999), constante de inibição (K_i) (Chen *et al.*, 2000), constante de dissociação (K_d) (Youngs *et al.*, 2000) ou avalia-se ainda alterações na velocidade máxima (V_{max}) e constante de Michaelis-Menten (K_m) (Rahman *et al.*, 2004).

2 – OBJETIVOS

O objetivo geral do presente trabalho consistiu em estimar os efeitos tóxicos agudos do DFB e seu metabólito PCA nos organismos-teste, algas *Pseudokirchneriella subcapitata*, microcrustáceos *Daphnia similis* e os peixes *Oreochromis niloticus*, incluindo algumas alterações bioquímicas, com vistas a suprir a necessidade de dados na literatura acerca da toxicidade destes produtos e analisar o possível uso da análise enzimática como indicador de poluição de recursos hídricos em programas de biomonitoramento e auxiliar a legislação vigente quanto ao estabelecimento de níveis máximos permissíveis.

Desta forma os objetivos específicos foram:

- Determinar parâmetros de toxicidade aguda do DFB e PCA para as daphnias, algas e peixes e verificar a susceptibilidade relativa entre as espécies.
- A partir das concentrações em que foi observado efeito nos estudos acima, comparar os efeitos *in vivo* do DFB e PCA sobre as atividades da FAT, Falc, CAT e SOD dos organismos-teste.
- Realizar estudos *in vitro* do efeito do DFB e PCA na atividade das enzimas estudadas, a fim de, obter as constantes cinéticas (K_m , K_i), velocidade máxima da reação e concentração de inibição média (V_{max} , CI_{50}) e elucidar os mecanismos de ação destes compostos.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Compostos Avaliados

Foram avaliados o inseticida Diflubenzuron (DFB), presente na formulação tipo pó molhável (Dimilin[®], 250 g/Kg, Chemtura Indústria Química do Brasil Ltda) e seu metabólito PCA (99% pureza, Sigma-Aldrich).

As soluções estoque do DFB e PCA foram preparadas para uso imediato, não havendo o armazenamento destas. Devido à baixa solubilidade do DFB (0,08 mg/L a 20° C) o mesmo foi dissolvido em acetona para o preparo das soluções estoque, de modo que esta não interferisse nos testes onde a concentração final da acetona no recipiente teste foi é de 0,1ml por Litro (OECD, 1984). Para isso 1,2 gramas do produto foi dissolvido em 50 mL de acetona. Em seguida pipetou-se 1 mL dessa solução em 100 mL de água de cultivo. Desta última foi pipetado 200 µL e diluído em 20 mL de água de cultivo.

3.2 Obtenção e condições de cultivo de Algas

As algas foram obtidas através de culturas fornecidas pelo Laboratório de Ecotoxicologia e Biossegurança da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP, e replicadas em meio líquido preparado tal como recomendado pela OECD 201 (OECD, 1984) (Anexo 2). O cultivo das algas foi realizado no Laboratório de Enzimologia do Instituto de Biologia – UNICAMP - sob condições controladas de luminosidade e temperatura.

As culturas foram crescidas em erlenmeyers de 250 mL selados com tampões de algodão e 200 mL de meio esterilizado. Os recipientes foram incubados em ambiente com temperatura controlada ($20 \pm 2^{\circ}\text{C}$) sob luz branca fluorescente contínua, (3.000 – 4.000 lux) e agitadas, manualmente, duas vezes por dia. A cada 40 a 60 dias, novas culturas foram preparadas pela inoculação de aproximadamente 5×10^4 células.mL⁻¹ em novo meio de cultura (Jonsson, 2005).

3.3 Obtenção e condições de cultivo de Daphnias

As daphnias foram adquiridas do Laboratório de Ecotoxicologia e Biossegurança da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP e seu cultivo foi realizado no Laboratório de Enzimologia do Instituto de Biologia – UNICAMP. Estes organismos foram cultivados em água de torneira declorinizada e mantidos em estufa de germinação (Eletrolab) na temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$, com intensidade luminosa de 1000 lux e fotoperíodo 16-8hs (claro/escuro), de acordo com a norma da OECD (1984). Foram diariamente alimentada com suspensão de algas clorofíceas unicelulares das espécies *Pseudokirchneriella subcapitata*, preparada conforme Anexo 3, e *Chlorella pyrenoidosa*. Esta última foi preparada à partir de cápsulas de 500mg em 500mL de água destilada, podendo ser utilizada para alimentação das daphnias por uma semana.

3.4 Obtenção e condições de cultivo de Peixes

Os peixes foram adquiridos da piscicultura Brumado – Mogi Mirim - e aclimatados no Laboratório de Ecotoxicologia e Biossegurança da Embrapa Meio Ambiente – Jaguariúna –SP.

O cultivo dos peixes foi realizado de acordo com a norma da OECD 203 (OECD, 1992); em condições de temperatura controlada entre $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16h luz/8h escuro. Os animais foram mantidos em tanques plásticos de 250 L com água de torneira aquecida, declorinizada, com pH e temperatura controlados e aeração constante e foram alimentados com a ração comercial Tetramin em flocos (fornecida 1 vez ao dia).

Todos os experimentos com os peixes encontram-se de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a lei vigente nº 11.794/2008, tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais da Universidade Estadual de Campinas- CEUA/ UNICAMP (**Protocolo nº2756-1 em ANEXO 1**).

Nos testes em que houve a necessidade do sacrifício dos peixes o mesmo foi realizado com anestesia seguida da secção medular sem provocar qualquer sofrimento aos animais. Os peixes, após o sacrifício, foram recolhidos por uma empresa terceirizada que fez o descarte correto dos mesmos.

3.5 Testes de toxicidade aguda para obtenção da Concentração Efetiva Media (CE50)

Para se obter a CE50-48h, CI50-96h e CL50-96h de cada composto, respectivamente para microcrustáceos, algas e peixes, foram testadas as concentrações apresentadas na Tabela 1. A escolha das concentrações dos compostos DFB e PCA para a realização deste teste foi baseada em valores previamente pesquisados na literatura.

Tabela 1. Concentrações finais de DFB e PCA que foram testadas para obtenção da CE50

Organismo-teste	Concentrações DFB (mg.L⁻¹)	Concentrações PCA (mg.L⁻¹)
Daphnia	0- 0,001- 0,002- 0,004- 0,006- 0,015	0- 0,077- 0,15- 0,31- 0,62- 1,24
Alga	0- 0,18- 0,36- 0,6	0- 0,18- 0,36- 0,6- 1- 20- 40- 100
Peixe	0- 0,1- 1- 10- 100	0- 0,1- 1- 10- 17- 31- 55- 100

3.5.1 Teste de toxicidade em Algas

O teste de toxicidade dos compostos DFB e PCA com as algas seguiu o protocolo OECD 201 (OECD, 2006).

Primeiramente foi construída uma curva padrão em função do número de células por volume (determinado através da microscopia óptica em câmara de Neubauer) e a absorvância a 750 nm, (Jonsson, 2005).

Para os testes de toxicidade aguda foram utilizadas suspensões de algas em fase exponencial de crescimento (5×10^3 - 10^4 cels/mL), ou seja, com uma absorvância em 750 nm de aproximadamente de 0,4.

As algas foram expostas a diversas concentrações de DFB e PCA (Tabela 1), em triplicata, durante 96 horas, em pequenos frascos selados (Figura 6).

Cada concentração dos compostos foi preparada em água de cultivo das algas de acordo com as normas OECD 201 (OECD, 1984).

Em cada frasco foi pipetado 2 mL de suspensão de algas e 0,5 mL de uma solução estoque preparada de cada composto avaliado, obtendo-se a concentração final apresentada na Tabela 1. No grupo controle foi pipetado 2 mL de algas e 0,5 mL de água de cultivo.

Durante o teste os frascos foram mantidos sob agitação, temperatura $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e luminosidade contínua. As absorvâncias das suspensões algáceas foram determinadas em 0, 24, 48, 72 e 96h através de espectrofotometria em 750 nm.

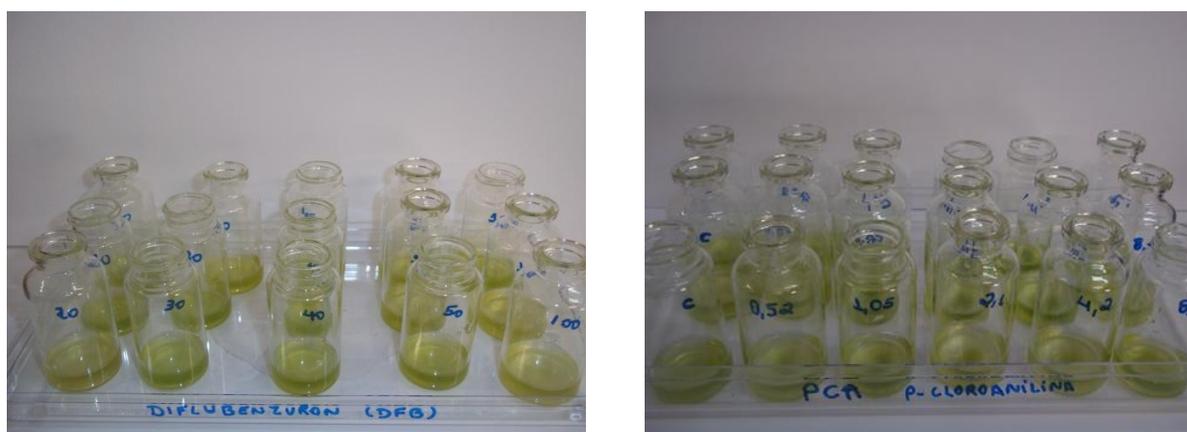


Figura 6. Determinação da CI50-96h para algas.

As algas foram expostas a diferentes concentrações de DFB e PCA, em triplicata, para a determinação dos valores de CI50, como descrito em Métodos.

O valor da concentração de inibição média quanto ao crescimento algáceo (CI50-96h) e seu intervalo de confiança 95% foram estimados através do modelo de regressão linear do software Statgraphics® Plus Versão 2.

3.5.2 Teste de toxicidade em Daphnias

O teste de toxicidade aguda com daphnias foi realizado com base no protocolo OECD 202 (OECD, 1984). O método consistiu na exposição de 20 neonatas de daphnias a cada concentração dos produtos por um período de 48 horas, em estufa com temperatura controlada a $18 \pm 2^\circ\text{C}$, sem alimentação e no escuro, sendo que no controle foi utilizado somente o meio de cultivo (Figura 7).



Figura 7. Teste de toxicidade aguda com os microcrustáceos para obtenção da CE50-48h.

O teste foi realizado colocando-se 5 daphnias em cada béquer (4 réplicas), e estes organismos foram expostos à diversas concentrações de DFB e PCA por 48h sob condições controladas de luminosidade e temperatura.

Os parâmetros físico-químicos como pH, oxigênio dissolvido, condutividade e dureza da água de cultivo foram medidos antes e após o experimento (Apêndice 1).

Simultaneamente ao ensaio com os compostos especificados foi realizado um teste de sensibilidade do organismo-teste, avaliado através da EC50-48h ao poluente de referência dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$), sendo a faixa aceitável de 0,04 a 0,17 $mg.L^{-1}$ para daphnias (CETESB, 1994), (Apêndice 2).

Após as 48 horas de teste, os indivíduos imóveis foram contados e os dados obtidos foram analisados estatisticamente, através do programa EPA probit versão 1.5, para a obtenção da CE50-48h e seu intervalo de confiança 95%.

3.5.3 Teste de toxicidade em Peixes

Nos testes de toxicidade aguda para os peixes foram utilizados alevinos de tilápias com tamanho de aproximadamente 3 cm, aclimatados pelo período de uma semana em tanques plásticos de 175 litros com água de clorinizada, submetidos a um fotoperíodo de 16h luz/8h escuro e temperatura de $28 \pm 2^\circ C$ (Figura 8). Durante este período, os peixes foram alimentados com a ração comercial Tetramin em flocos e ficaram em observação a fim de verificar possíveis sinais de doenças, estresse,

presença de parasitos, danos físicos e mortalidade. Após o período de aclimação os peixes foram transferidos para aquários de 10 litros, dotados de aeração artificial, contendo a solução-teste. O teste foi realizado em duplicata e a densidade foi de 2 peixes/L. O sistema utilizado neste teste foi o estático porque as soluções-teste de DFB e PCA não são voláteis e portanto, não requerem a renovação da água dos tanques para manter sua concentração inalterada (Figura 9), (Konnecker *et. al.*, 2003). O período total de exposição aos compostos químicos foi de 96 horas, durante as quais os peixes não foram alimentados e mantidos sob as mesmas condições de temperatura e luminosidade acima citadas. Após as 96 horas de teste, os indivíduos mortos foram contados (OECD, 1992) e os dados obtidos foram analisados estatisticamente, através do programa EPA probit versão 1.5, para a obtenção da CL50-96h e seu intervalo de confiança 95%. Os parâmetros físico-químicos da água de cultivo foram avaliados antes e após o teste (Apêndice 3).



Figura 8. Aclimação dos peixes para a realização do teste de toxicidade aguda para obtenção da CL50-96h.

Tanques com capacidade para 175 litros com água dechlorada, aeradores e filtros. Temperatura da sala $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e luminosidade 16h luz/8h escuro.



Figura 9. Teste toxicidade aguda para peixes para obtenção da CL50-96h.

O teste de foi realizado com os peixes, de aproximadamente 3 cm de comprimento, em aquários com as soluções testes, dotados de aeração sob condições controladas de luminosidade e temperatura.

3.6 Estudos *in vivo*

Para a avaliação da atividade das enzimas FAT, Falc, CAT e SOD, os organismos-teste foram expostos a uma concentração equivalente à CE50, e a outras duas concentrações que representaram 25% e 75% da CE50 (Martinez *et. al.*; 2004).

3.6.1 Tratamento das algas e processamento das amostras

Neste teste, 30 mL da suspensão de algas em fase exponencial de crescimento foram expostas aos compostos DFB e PCA em triplicata durante 96 horas, sob agitação, temperatura $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e luminosidade contínua. Após 96 horas as algas foram centrifugadas por 10 minutos a 4000 r.p.m. e 4°C na centrífuga eppendorf 5810R v8.2 com o rotor A-4-8. O sobrenadante (meio de cultivo) foi descartado e o precipitado (algas) foi suspenso em tampão apropriado para cada dosagem enzimática, na proporção 1:4 (massa/volume). A suspensão foi congelada em nitrogênio líquido e descongelada a temperatura ambiente três vezes para ruptura da parede celular. Em seguida houve a sonicação da mesma durante 50 segundos seguido do intervalo de 20 segundos (1 ciclo) na amplitude 70%. O processo foi repetido duas vezes e realizado em tubos falcon acondicionados num recipiente de vidro com gelo.

As suspensões resultantes dos processos de disrupção celular, acima mencionados, foram centrifugadas a 10.000 r.p.m. durante 20 minutos na centrífuga eppendorf 5810R v8.2 com o rotor FA-45-30-11. O líquido sobrenadante (extrato bruto) foi utilizado para os ensaios de avaliação da atividade enzimática.

3.6.2 Tratamento das daphnias e processamento das amostras

Para estes estudos foram utilizados aproximadamente 100 organismos por réplica, ou cerca de aproximadamente, 0,2 gramas de daphnias (peso seco). Os organismos foram expostos aos compostos DFB e PCA durante 48 horas em cristalizadores sem alimentação e no escuro de acordo com o protocolo OECD 202 (OECD, 1984). Após este período, os organismos foram coletados com auxílio de peneira Granutest (0,5 mm, ABNT 35), colocados em tubos falcon e pesados. O teste foi realizado em triplicata.

Posteriormente, os microcrustáceos foram sonicados durante 50 segundos com amplitude de 70% em tampão apropriado para a dosagem enzimática, na proporção 1:4 (massa/volume). Durante este processo os tubos falcon ficaram imersos em gelo. O homogeneizado obtido foi centrifugado a 10.000 r.p.m. na centrífuga eppendorf 5810R v8.2 com o rotor FA-45-30-11 por 10 minutos e o sobrenadante constituiu o extrato a ser utilizado nas dosagens bioquímicas (Figura 10).

Os parâmetros físico-químicos da água de cultivo das daphnias foram avaliados antes e após o teste (Apêndice 4).

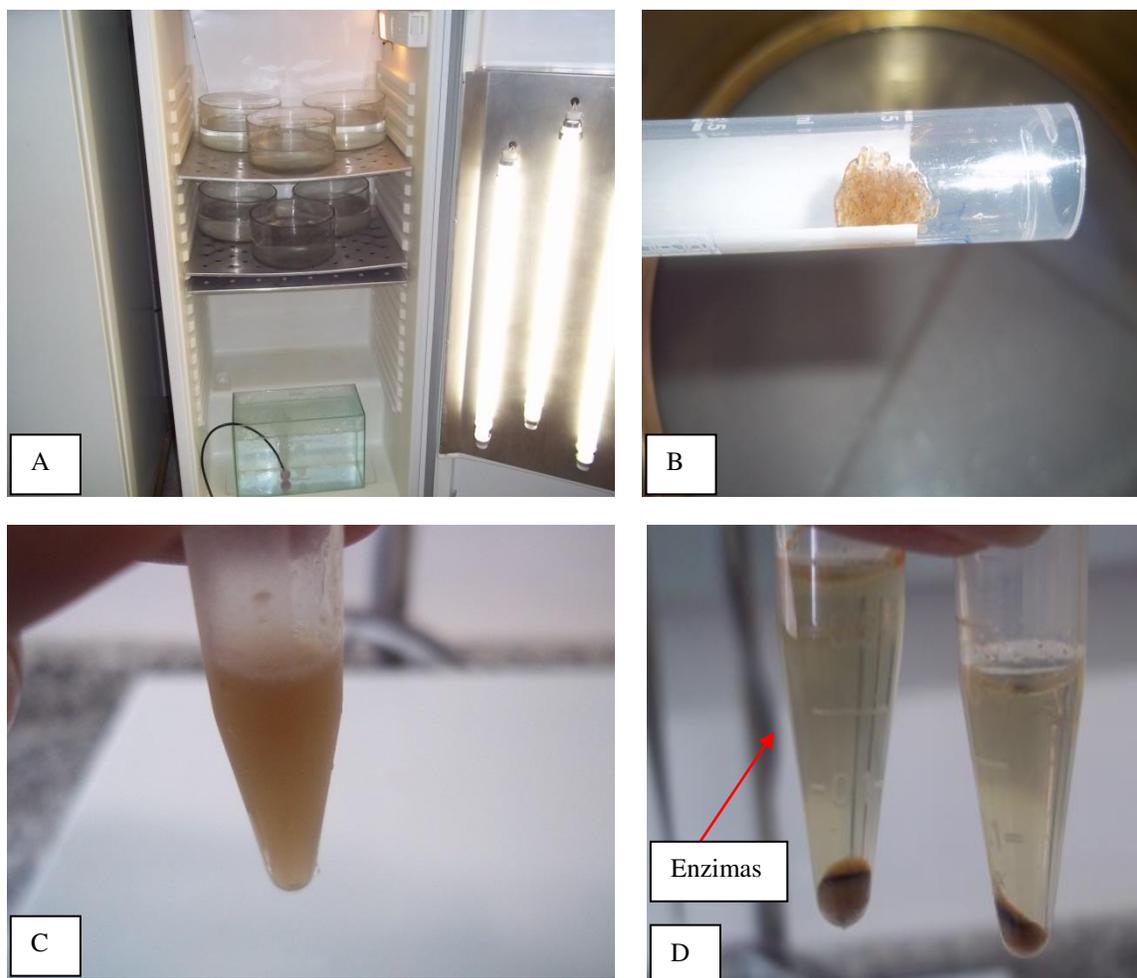


Figura 10. Exposição das daphnias aos compostos DFB e PCA para realização das análises enzimáticas.

A) Cristalizadores com daphnias expostas a diferentes concentrações dos compostos por 48h. **B)** Organismos coletados após 48h e pesados (aproximadamente 0,2 g). **C)** Extrato obtido após sonicação dos organismos conforme explicado em métodos. **D)** Sobrenadante obtido após centrifugação contendo enzimas para análises bioquímicas.

3.6.3 Tratamento dos Peixes e processamento das amostras

Foram utilizados peixes adultos com tamanho e peso aproximado de 12 cm e 30 gramas ($\pm 2g$). Para cada concentração testada dos compostos, foram utilizados 10 peixes. O teste foi realizado em duplicata. Os organismos foram expostos aos compostos dentro de tanques plásticos contendo aproximadamente 210 Litros de água decolorizada, respeitando o limite de 1g de peixe por litro de acordo com o protocolo

203 da OECD (OECD, 1992). O teste foi estático, ou seja, não houve troca da água, e os tanques foram dotados de aeração constante, luminosidade (16h luz/8h escuro) e temperatura ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$) controlada. A duração do experimento foi de 96h onde os peixes permaneceram sem alimentação. Após este período, os peixes foram coletados, anestesiados com 800 uL de cloridrato de benzocaína com concentração de 0,2 mg/ml em 1 L de água, e sacrificados através de secção medular. O fígado foi retirado e em seguida utilizado para preparação de extratos para dosagens enzimáticas. O fígado de um mesmo peixe foi dividido em partes iguais, pesado e homogeneizado em tampão apropriado para cada enzima na proporção de 1:4 (massa/volume). Após, foi realizada a centrifugação do homogenato a 10.000 r.p.m. na centrífuga eppendorf 5810R v8.2 com o rotor FA-45-30-11 por 10 minutos, onde se obteve o sobrenadante contendo as enzimas que foram analisadas nos testes bioquímicos (Figura 11). Os parâmetros físico-químicos da água de cultivo dos peixes foram avaliados antes e após o teste (Apêndice 5).

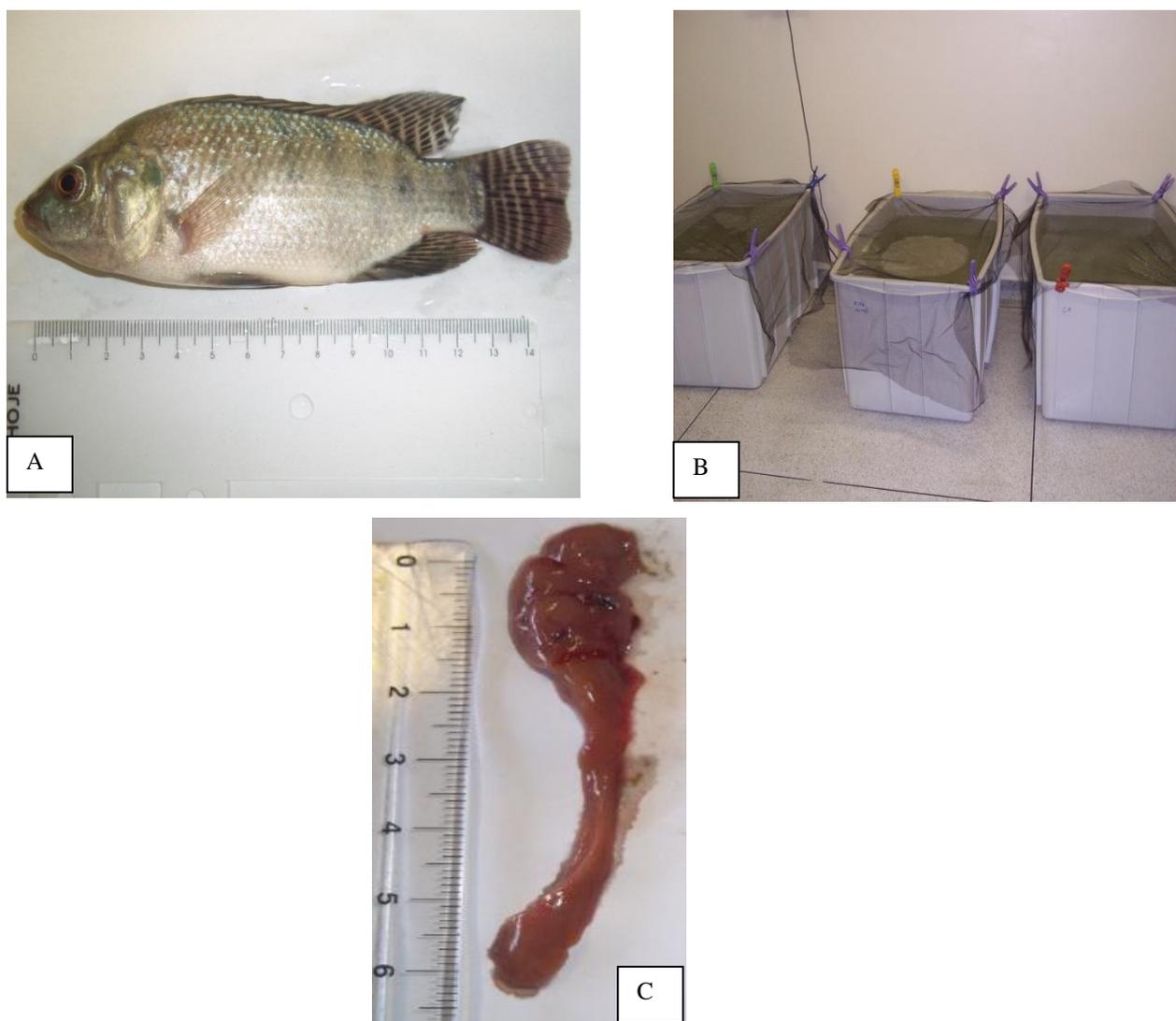


Figura 11. Peixes e condições experimentais para os testes bioquímicos.

A) Peixe de 30 gramas e aproximadamente 12 cm utilizado para o teste bioquímico. **B)** Tanques de 210 Litros, com água declorinizada e aeração, que armazenaram os peixes durante os testes bioquímicos sob condições de temperatura e luminosidade controladas. **C)** Fígado de um peixe controle, extraído após 96h de teste, medindo aproximadamente 6 cm e utilizado para preparo do extrato enzimático.

3.6.4 Análises enzimáticas

3.6.4.1 Fosfatase ácida (FAT)

Foi determinada medindo-se o p-nitrofenol (pNP) liberado, de acordo com o método descrito por Jonsson e Aoyama (2007). A atividade da FAT foi determinada a 37°C usando p-nitrofenilfosfato (pNPP) 0,01M como substrato em tampão acetato 0,1M (pH 5,0), em um volume final de 1 mL. Após a adição da enzima o tempo de reação variou de 40 a 60 minutos. Esta foi paralisada com a adição de 1 mL de hidróxido de sódio 1M. A absorbância foi mensurada a 405 nm, devido à formação de pNP (coeficiente de extinção molar de $1,83 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de pNP por minuto. Portanto, a atividade da FAT foi expressa como $\mu\text{moles pNP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$.

3.6.4.2 Fosfatase alcalina (Falc)

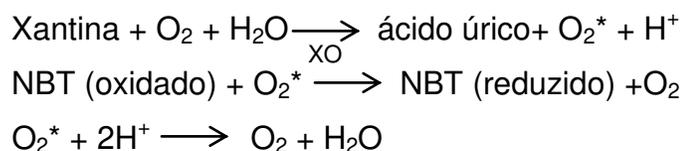
Foi aplicado o mesmo protocolo para FAT, com exceção de que se utilizou tampão glicina 250 mM (pH 9,4) e MgCl_2 como cofator.

3.6.4.3 Catalase (CAT)

Na avaliação da atividade da CAT foi utilizado peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como substrato, sendo o decaimento da absorbância (240 nm) monitorado em função do tempo, de acordo com Aebi (1983). Para isso, o extrato foi adicionado em 990 μL de solução de H_2O_2 0,03 M preparada em tampão fosfato pH 7. A atividade da catalase foi expressa em $\text{mmoles de } \text{H}_2\text{O}_2 \text{ degradado} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg} \cdot \text{proteína}^{-1}$.

3.6.4.4 Superóxido dismutase (SOD)

A análise da atividade da SOD se fundamentou na inibição promovida por esta enzima na redução do NBT (nitro Blue Tetrazolium), com a consequente formação de azul de formazan, composto colorido que absorve luz em 560 nm, de acordo com Ukeda *et al* (1997). As equações que resumem o princípio de determinação da atividade da SOD são mostradas a seguir:



Na presença de xantina e O_2 , a xantina oxidase (XO) produz o ânion superóxido (O_2^*). O NBT sofre redução na presença de O_2^* . A reação de produção de NBT reduzido (azul de formazan) é inibida na presença de SOD pelo fato de requerer O_2^* . Quanto maior a atividade da SOD, maior a inibição na formação do composto colorido.

A atividade da SOD foi expressa como $\text{USod} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$

3.6.5 Quantificação de proteína

Para a determinação da atividade específica, (atividade enzimática / teor de proteína), a proteína foi quantificada pelo método de Lowry, como descrito por Hartree (1972), utilizando a albumina de soro bovino como padrão.

3.7 Estudos *in vitro*

Os testes *in vitro* foram realizados pela adição de diferentes concentrações do DFB e PCA (Apêndice 6) em um sistema de reação contendo o substrato juntamente com a enzima extraída conforme descrito nos itens 3.6.1 – 3.6.2 e 3.6.3. As concentrações dos compostos, DFB e PCA, foram escolhidas para os testes *in vitro* por serem suficientes para alterar a atividade da enzima, ou na concentração máxima do composto na forma solúvel no sistema de reação, ou ainda, numa concentração apropriada que não promovia interferência no método de dosagem da enzima (Jonsson, 2005). Antes das análises enzimáticas, os extratos contendo as enzimas FAT, Falc, CAT e SOD, foram previamente expostos com as diferentes concentrações de DFB e PCA por 20 minutos. As fosfatases foram expostas na temperatura de 37°C e a catalase e superóxido dismutase em banho de gelo, pois altas temperaturas podem degradar estas enzimas. Após os 20 minutos de exposição, foram realizadas as dosagens enzimáticas conforme descrito nos itens 3.6.4.1- 3.6.4.2- 3.6.4.3 e 3.6.4.4. De acordo com Jonsson (2005), a razão para o uso desta condição é que em um sistema de pré-exposição a enzima é submetida a uma condição mais severa de interação com

o agente químico, sem a presença de compostos, como por exemplo, o substrato, que possa proteger a enzima, pela formação de um complexo enzima-substrato. As enzimas que tiveram sua atividade alterada foram utilizadas para o estudo cinético onde foi determinada a CI50 (concentração de inibição média), a constante de Michaelis-Mentem (Km), que determina a afinidade da enzima pelo substrato, a constante de inibição (Ki), que determina a afinidade do composto pela enzima e o tipo de inibição que o composto pode provocar sobre a enzima.

3.7.1 Constante de Michaelis-Mentem (Km) e velocidade máxima (Vmax)

A cinética enzimática foi determinada com o substrato p-NPP na faixa de concentração de 0,05 – 30,0 mM para as fosfatases e com H₂O₂ para a catalase (2 – 100 mM). Os valores de atividade enzimática obtidos foram utilizados para calcular a constante de Michaelis-Mentem (Km) e a velocidade máxima (Vmax), sendo estes parâmetros computados através do programa SigmaPlot versão 12.0.

3.7.2 Concentração de inibição média (CI50) e constante de inibição (Ki)

A concentração de inibição média (CI50) e seu intervalo de confiança 95% foram calculados pelo ajuste dos dados das curvas de regressão obtidos pela determinação da atividade enzimática em função de diferentes concentrações do composto inibidor.

Para a determinação da Ki a atividade das fosfatases e das catalases foi avaliada na faixa de concentração de substratos conforme descrito no item 3.7.1, na ausência e na presença de três concentrações dos compostos inibidores, utilizando-se o programa Sigmaplot 12.0.

3.8 Análise dos resultados

Todos os resultados foram expressos como média \pm dp de, no mínimo, três experimentos realizados em triplicata. Os resultados foram submetidos à análise estatística com o software GraphPad versão 3.05 (GraphPad Software, Inc., San Diego Califórnia USA), utilizando-se de testes de análise de variância (ANOVA) e o teste de Dunnet para comparações de médias em relação ao controle (Zarr, 1996). Valores de *p* iguais ou menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Testes de toxicidade aguda

Os dados de efeito do DFB na mobilidade, crescimento e sobrevivência, respectivamente para daphnias, algas e peixes, estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Toxicidade do DFB para os organismos-teste

Organismo-teste	Endpoint	Valor toxicidade (mg.L ⁻¹)
Daphnia	CE50-48hs	0,009 (0,007- 0,013)
Alga	CI50-96hs	0,00096 (0,00077- 0,0018)
Peixe	CL50-96hs	>100

Intervalo de confiança de 95% entre parênteses

De acordo com os resultados obtidos para a CE50 do DFB nesta pesquisa, o inseticida pode causar diminuição da taxa de crescimento das algas e provocar imobilidade/mortalidade das daphnias. A concentração de DFB que inibiu 50% o crescimento das algas foi de 0,00096 mg.L⁻¹. Esta concentração foi cerca de 10 vezes menor que a concentração que afetou a mobilidade dos microcrustaceos em 50%. Portanto, neste estudo, o DFB se mostrou mais tóxico para as algas que para as daphnias. Na literatura existem poucos trabalhos descritos a respeito da toxicidade de inseticidas para plantas aquáticas. A CL50 para o DFB obtida pela EPA, (1997) para algas foi de 200 µg.L⁻¹. Do ponto de vista ecológico, as algas representam um grupo cosmopolita, ocorrendo na superfície de todos os tipos de solo tendo, porém sua maior distribuição nas águas onde constituem os principais produtores primários de compostos orgânicos de carbono. São, portanto, parte fundamental da cadeia alimentar nos ecossistemas aquáticos (Round, 1973).

Os dafinídeos são organismos planctônicos filtradores que se alimentam de algas, bactérias e outras partículas em suspensão. Neste estudo a concentração de 0,009 mg.L⁻¹ de DFB ocasionou a imobilidade de 50% da população de daphnias. Esta

concentração está de acordo com os trabalhos encontrados na literatura que classificam o inseticida DFB como um produto de elevada toxicidade para invertebrados aquáticos (Fischer e Hall, 1992).

Nebeker *et. al.*, (1983), em estudos com este inseticida, calcularam uma CE50-48h de $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ para a *Daphnia magna*, sob temperatura de $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e pH de 7,3. De acordo com estes autores, o inseticida pode eliminar totalmente populações de daphnias expostas a períodos prolongados ao DFB.

Organismos zooplanctônicos foram utilizados por Mabilia e colaboradores (2004) na avaliação da toxicidade do DFB em efluentes de pisciculturas. As concentrações efetivas médias (CE50-48h) calculadas foram: $0,18 \mu\text{g.L}^{-1}$ para *Daphnia similis*, $0,51 \mu\text{g.L}^{-1}$ para a *Ceriodaphnia dubia*, $0,05 \mu\text{g.L}^{-1}$ para *Ceriodaphnia silvestrii*, e $0,039 \mu\text{g.L}^{-1}$ para *Simocephalus serrulatus*.

Estudos da EPA (2007) mostraram uma CL50-48h de $0,15 \mu\text{g.L}^{-1}$ para *D. magna* expostas ao DFB.

Segundo Schalch, *et. al.*, (2005); Fujimoto *et al.*, (1999); Kubitza e Kubitza, (1999), o DFB é frequentemente usado em piscicultura com eficácia nas concentrações que variam entre 0,5 a 2 mg.L^{-1} . Estas concentrações ultrapassam muito a concentração letal média, encontrada neste trabalho, para as algas ($0,00096 \text{ mg.L}^{-1}$) e para *Daphnia similis* ($0,009 \text{ mg.L}^{-1}$). Apesar da CL50 do composto DFB estar compreendida em uma larga faixa de valores, os mesmos são mínimos em relação à concentração do produto quando utilizado na piscicultura. A variabilidade de valores da CL50 pode ser explicada pela sensibilidade que existe entre as espécies de organismos. Um nível seguro para uma espécie de peixe, alga ou daphnia pode não ser para outra espécie que faz parte da mesma comunidade biológica.

Este resultado pode interferir diretamente na dinâmica do ecossistema aquático. De acordo com Mangas-Ramírez, *et al.* (2001), organismos zooplanctônicos, incluindo a *Daphnia magna*, são responsáveis por 80% da produção secundária de alimento nesses ambientes. Portanto, alterações significativas sobre a comunidade zooplanctônica refletirão em desequilíbrio do ecossistema. As daphnias são os consumidores primários do fitoplâncton e fonte de alimento para consumidores secundários (predadores). Dada sua importância na cadeia alimentar, supõe-se que os

organismos num ambiente natural, quando perturbados por algum contaminante, por exemplo, um inseticida, produzirão poucos neonatos. A falta dos neonatos poderá diminuir a taxa dos organismos fitoplanctônicos e, como consequência, poder-se-á ter um crescimento incontrolado de algas e aumento do problema de eutrofização nos corpos d'água (Clément e Zaid, 2004).

Além disso, os organismos zooplanctônicos constituem um elo entre produtores primários e níveis tróficos superiores, e exercem significativa influência na biomassa e na composição das espécies algais. Esses organismos estão sujeitos a diferentes níveis de estresse durante o ciclo de vida. Caso os agentes estressores estejam presentes por um período longo de tempo, eles poderão alterar a fisiologia do organismo, decrescer a reprodução e a sobrevivência, e assim influenciar nas taxas de produtividade secundária e na estrutura das populações e da comunidade (Fernández-Casalderrey *et al.*, 1994).

O DFB, indevidamente utilizado na piscicultura, não foi tóxico para os peixes *Oreochromis niloticus*. O valor de CL50-96h do inseticida DFB, calculado para este organismo, foi superior a 100 mg.L⁻¹. Lopes (2005) também observou baixa toxicidade do DFB para o pacu. Segundo o autor, a CL50-96h do DFB para o pacu (*P. mesopotamicus*) foi superior a 2000 mg.L⁻¹. Esse mesmo autor observou que mesmo em altas doses (5 g.L⁻¹), não foi observada mortalidade dos animais expostos ao inseticida.

Na literatura a toxicidade aguda do inseticida DFB também foi avaliada para várias espécies de peixes. A CL50-96h calculada para truta arco-íris, com peso corporal médio de 1,5 g, foi de 240 mg.L⁻¹, sob condições de pH 7,4 e temperatura de 10° C (Ficher e Hall, 1992). Para o bagre do canal, com peso corporal médio de 2,0 g, a CL50-96h foi superior a 100 mg.L⁻¹, sob pH de 7,4 e temperatura de 22° C (Fischer e Hall, 1992).

Para o *Poecilia reticulata* com quatro semanas de idade, concentrações inferiores a 36 µg.L⁻¹ não causaram qualquer efeito sobre a espécie, em condições de pH 7,3 e temperatura 20° C (Nebeker *et al.*, 1983).

Apesar de ter sido pouco tóxico para os peixes, o DFB pode causar danos indiretos aos mesmos. O risco indireto para espécies de peixes pode ser definido como

perda de habitat ou de presas que fornecem alimento para estas populações. Outro risco é a formação do metabólito PCA que, segundo dados na literatura, teria maior toxicidade aguda para peixes que o DFB (Nebeker *et al.*, 1983).

A toxicidade do metabólito PCA para os organismos testes é demonstrada na Tabela 3.

Tabela 3. Toxicidade do PCA para os organismos-teste

Organismo-teste	Endpoint	Valor toxicidade (mg.L ⁻¹)
Daphnia	CE50-48hs	0,27 (0,067 - 0,44)
Alga	CI50-96hs	>100
Peixe	CL50-96hs	24 (19.25 - 30.64)

Intervalo de confiança de 95% entre parênteses

O PCA praticamente não foi tóxico para as algas. O valor de toxicidade encontrado para este composto nestes organismos está acima de 100 mg.L⁻¹.

Em algas verdes, *Scenedesmus subspicatus*, estudos mostraram uma CL50-168h, para PCA, de 2,1 mg.L⁻¹ (Schmidt, 1989).

Um fato que pode explicar a insensibilidade das algas frente à ação do PCA seria a decomposição do composto na presença de luz e a temperaturas elevadas (250-300°C). Talvez o composto tenha sido fotodegradado durante o teste que foi conduzido com luminosidade contínua (BUA, 1995).

O composto PCA foi cerca de 30 vezes menos tóxico para os microcrustáceos que o DFB. A CL50-48h do PCA para os dafnídeos foi de 0,27mg.L⁻¹ resultado comprovado por outros trabalhos que obtiveram a CL50-48h deste composto. Abe e colaboradores (1987) publicaram que a CL50-48h do PCA para *Daphnia magna* foi de 0.24 ±0.13 mg.L⁻¹.

Marillis e colaboradores (2010), em um estudo de toxicidade de cinco anilinas em crustáceos, protozoários e bactérias, comprovaram que PCA foi a anilina mais tóxica para os microcrustáceos *Daphnia magna* e obtiveram uma CL50-48h de 0,19 ±0,04 mg.L⁻¹.

Neste trabalho o DFB pode ter sido mais tóxico para as daphnias por atuar na inibição de formação de quitina. Estudos sobre a anatomia das daphnias mostraram que estes microcrustáceos possuem uma carapaça quitinosa que reveste seus órgãos (Heinz *et al.*, 1987). O DFB age especificamente sobre os insetos e crustáceos como um larvicida, interferindo na deposição de quitina em cutículas durante o desenvolvimento juvenil através da ecdise (Horst 1981; Antia *et al.*, 1985;. Cunningham 1986;. Machado *et al.*, 1990).

O resultado do estudo de toxicidade aguda do PCA, obtido para os peixes, mostrou que este foi mais tóxico que o DFB. Alguns trabalhos na literatura comprovam o resultado obtido (Tabela 4).

Tabela 4. Toxicidade do PCA para diversas espécies de peixes

Peixe	CL50 (mg.L ⁻¹)	Referência
<i>Bluegill</i>	2.4	Julin and Sanders, 1978
Truta arco-iris	14	Julin and Sanders, 1978
<i>Fathead minnow</i>	12	Julin and Sanders, 1978
<i>Channel catfish</i>	23	Julin and Sanders, 1978
<i>Japanese Medaka</i>	37.7	Holcombe <i>et al.</i> , 1995

4.2 Estudos *in vivo*

4.2.1 Análises enzimáticas das algas expostas ao DFB

Após a exposição das algas ao DFB por 96h, observou-se grandes alterações na atividade das enzimas FAT, Falc, CAT e SOD destes organismos e estas alterações enzimáticas não foram dose-dependentes.

A FAT das algas teve sua atividade aumentada, aproximadamente 350% para a concentração 0,0019 mg.L⁻¹ do DFB, em relação ao controle. Já a Falc destes organismos teve a atividade diminuída cerca 80, 43 e 85%, para as respectivas concentrações de DFB estudadas, em relação ao controle (Figura 12).

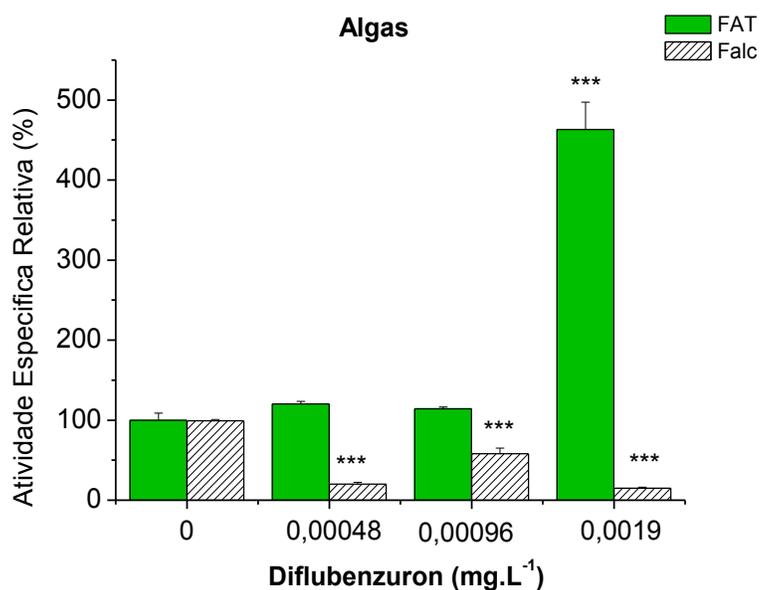


Figura 12. Efeito do DFB na atividade das FAT e Falc de algas.

As algas foram expostas ao DFB por 96 h e as atividades específicas relativas das FAT e Falc foram determinadas. *** $p < 0.001$

A CAT das algas teve a atividade aumentada 45% para a concentração de 0,00048 mg.L⁻¹ e 374% para a concentração 0,0019 mg.L⁻¹ de DFB em relação ao controle. A SOD teve 74% de sua atividade reduzida para a concentração letal média de DFB. As concentrações 0,00048 e 0,0019 mg.L⁻¹ do composto aumentaram a atividade da SOD 78 e 96% respectivamente (Figura 13).

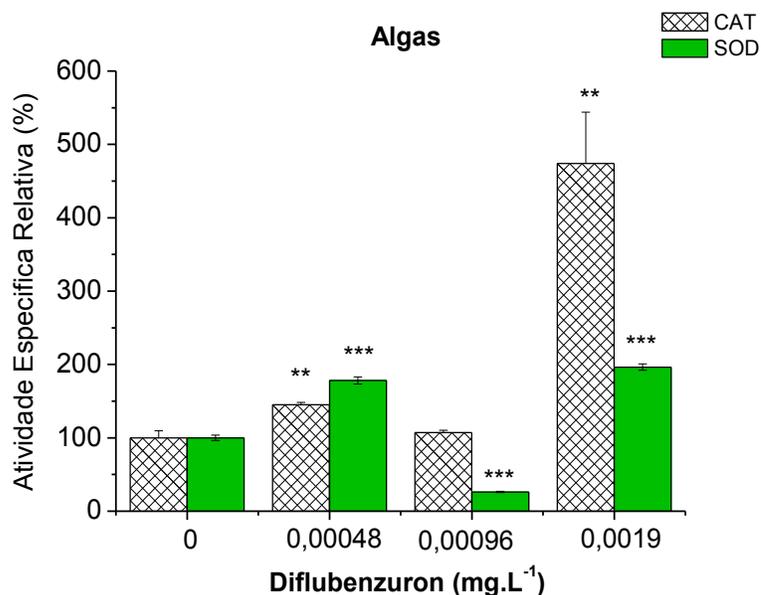


Figura 13. Efeito do DFB na atividade das CAT e SOD de algas.

As algas foram expostas ao DFB por 96 h e as atividades específicas relativas da CAT e SOD foram determinadas. *** $p < 0.001$ e ** $p < 0.01$

4.2.2 Análises enzimáticas das algas expostas ao PCA

A análise enzimática com as algas expostas ao PCA ocorreu apenas com a concentração de 100 mg.L^{-1} do composto, uma vez que não houve nenhuma concentração até esta que inibisse o crescimento das algas.

Neste teste observou-se que o PCA aumentou a atividade das enzimas estudadas e que este aumento não foi dose-dependente.

A Figura 14 mostra que a FAT das algas apresentou aumento de aproximadamente 227% em relação ao controle. No entanto, a Falc, estatisticamente, não sofreu alteração. A CAT e SOD destes organismos apresentaram um aumento de aproximadamente 500 e 200%, respectivamente, nas suas atividades (Figura15).

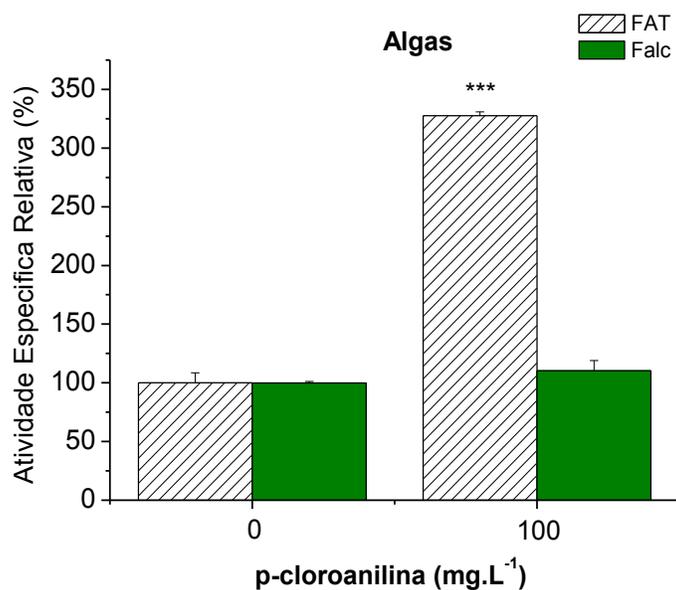


Figura 14. Efeito do PCA na atividade das FAT e Falc de algas.

As algas foram expostas ao PCA por 96 h e as atividades específicas relativas das FAT e Falc foram determinadas. Aumento de aproximadamente 227% da FAT *** $p < 0.001$

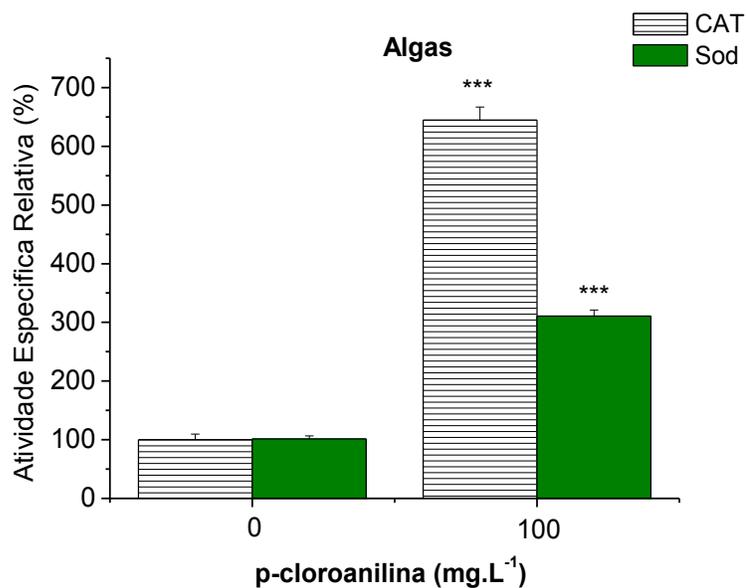


Figura 15. Efeito do PCA na atividade das CAT e SOD de algas.

As algas foram expostas ao PCA por 96 h e as atividades específicas relativas da CAT e SOD foram determinadas. *** $p < 0.001$

A concentração de 100 mg.L⁻¹ de PCA, no teste de toxicidade aguda para algas, não provocou nenhuma alteração em seu crescimento. Entretanto, nos testes enzimáticos, esta concentração aumentou a atividade das enzimas FAT, CAT e SOD das algas indicando que o PCA pode ser tóxico. Já a concentração subletal do DFB para as algas foi a que mais alterou a atividade das enzimas estudadas. Este fato reforça a necessidade de se aliar os testes de toxicidade aguda aos testes de avaliação enzimática. Vários autores vêm estudando as alterações enzimáticas em algas encontrando diferentes resultados de acordo com as condições experimentais conforme resumido na Tabela 5.

Tabela 5. Alteração da atividade de enzimas de algas pela ação de poluentes de origem agrícola.

Enzima	Poluente	Espécie	Efeito na atividade	Referência
Fosfatase ácida	Hexaclorobenzeno Hg ²⁺ , Pb ²⁺	<i>P. subcapitata</i> <i>S. bijuga</i>	diminuição diminuição	KONG <i>et al.</i> , 1998 FATHI, 2002
Fosfatase alcalina	Dimetoato Hg ²⁺ , Pb ²⁺	<i>C. vulgaris</i> <i>S. bijuga</i>	aumento diminuição	SHIZHONG <i>et al.</i> , 1997 FATHI, 2002
Catalase	Oxifluorfen Diuron Cd ²⁺ , Ni ²⁺	<i>S. obliquus</i> <i>S. obliquus</i> <i>S. armatus</i>	aumento inalterado aumento	GEOFFROY <i>et al.</i> 2002 EL ENANY & ISSA, 2001
Superóxido dismutase	Cu ²⁺ Ni ²⁺	<i>G.tenuistipitata</i> <i>S. acutus</i>	aumento diminuição	COLLEN <i>et al.</i> , 2003 RANDHAWA <i>et al.</i> , 2001

4.2.3 Análises enzimáticas das daphnias expostas ao DFB

Os daphnídeos foram expostos à CL50-48h ($0,009 \text{ mg.L}^{-1}$); e a $0,0045$ e $0,018 \text{ mg.L}^{-1}$ de DFB por 48h. As enzimas CAT, SOD, FAT e Falc dos daphnídeos, expostos a estas concentrações de DFB, sofreram alterações significantes nas suas atividades, porém, estas alterações não se mostraram dose-dependente.

A FAT aumentou significativamente sua atividade com a exposição às concentrações estudadas de DFB, como se pode observar na Figura 16. Em relação ao controle, o aumento foi de 187, 106 e 199% para as concentrações $0,0045$ – $0,009$ e $0,018 \text{ mg.L}^{-1}$ respectivamente. Como a FAT, a Falc também teve aumento em sua atividade mediante a exposição do DFB. A concentração $0,0045 \text{ mg.L}^{-1}$ aumentou 51% a atividade da Falc, $0,009 \text{ mg.L}^{-1}$, 38% e $0,018 \text{ mg.L}^{-1}$, 5%. Porém, esta última concentração não foi estatisticamente significativa (Figura 16).

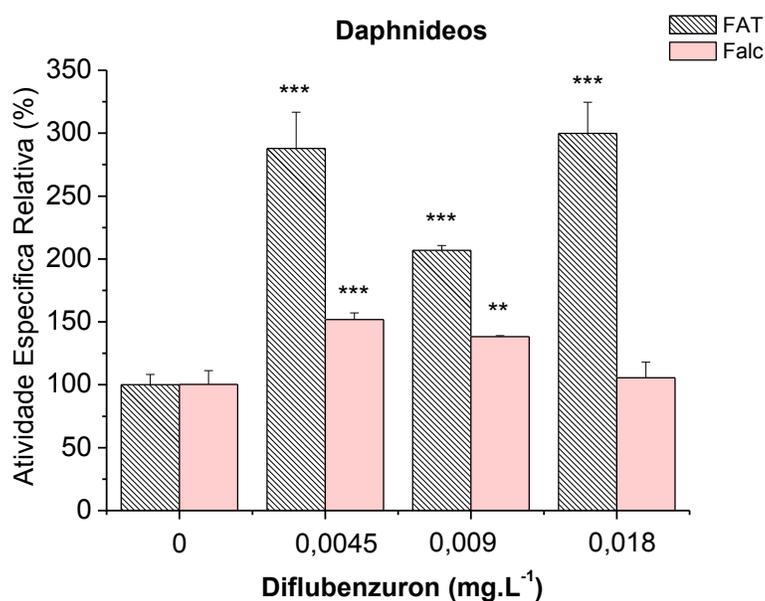


Figura 16. Efeito do DFB sobre a atividade das FAT e Falc de daphnias.

Os daphnídeos ($\pm 0,2\text{g}$) foram expostos ao DFB por 48 h e as atividades específicas relativas das FAT e Falc foram determinadas. A atividade na ausência do composto foi considerada como controle (100%). *** Aumento significativo ($p < 0.001$) e ** ($p < 0.01$) da atividade em relação ao controle.

As enzimas antioxidantes dos daphnídeos, (CAT e SOD), expostos ao DFB sofreram aumento significativo na sua atividade.

A CAT aumentou 50% a sua atividade mediante a exposição da CL50-48h do DFB (Figura 17). A SOD aumentou cerca de 3 vezes sua atividade em relação ao controle na concentração referente a 1/4 da CL50-48h do composto (0,0045 mg.L⁻¹) (Figura 17).

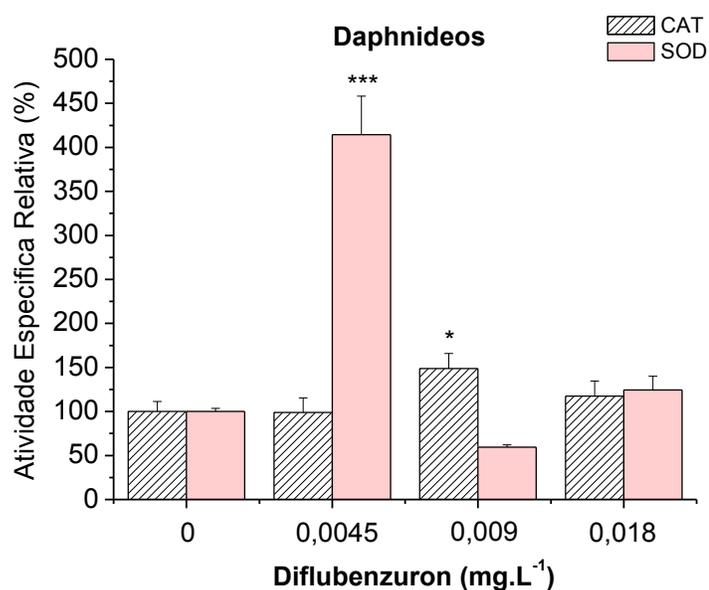


Figura 17. Efeito do DFB sobre a atividade das CAT e SOD de daphnias.

Os daphnídeos ($\pm 0,2g$) foram expostos ao DFB por 48 h e as atividades específicas relativas das enzimas antioxidantes foram determinadas. A atividade na ausência do composto foi considerada como controle (100%). *** Aumento significativo ($p < 0,001$) e * ($p < 0,05$) da atividade em relação ao controle.

4.2.4 Análises enzimáticas das daphnias expostas ao PCA

Os daphnídeos expostos ao PCA sofreram alterações enzimáticas. Porém, a maior parte destas alterações não se mostrou dose-dependente.

Para FAT, a concentração 0,135 mg.L⁻¹ do composto aumentou cerca de 60% sua atividade em relação ao controle, enquanto a CL50-48h e uma concentração acima desta (0,54 mg.L⁻¹) não alteraram significativamente sua atividade (Figura 18).

Para a Falc, a CL50-48h e a concentração acima desta (0,54 mg L⁻¹) aumentaram cerca de 25 e 33%, respectivamente, a sua atividade (Figura 18).

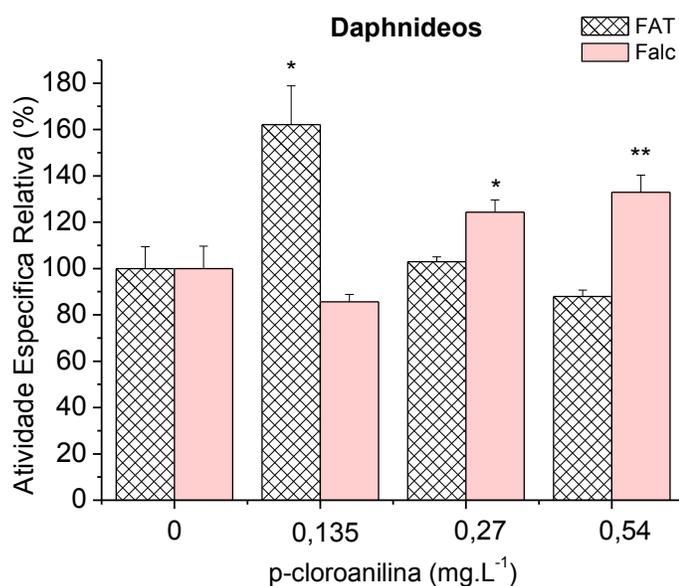


Figura 18. Efeito do PCA sobre a atividade das FAT e Falc de daphnias.

Os daphnídeos ($\pm 0,2g$) foram expostos ao PCA por 48 h conforme descrito em métodos e as atividades específicas relativas das fosfatases foram determinadas. A atividade na ausência do composto foi considerada como controle (100%). * Aumento significativo ($p < 0.05$) e ** ($p < 0.01$) da atividade em relação ao controle.

Os daphnídeos apresentaram um aumento significativo da atividade da CAT apenas para a concentração de $0,135 \text{ mg.L}^{-1}$ do composto. Este aumento foi cerca de 35% em relação ao controle. Ao contrário a CAT, a SOD destes organismos teve um decréscimo na atividade de 75, 42 e 30% conforme foi aumentando a concentração do PCA (Figura 19).

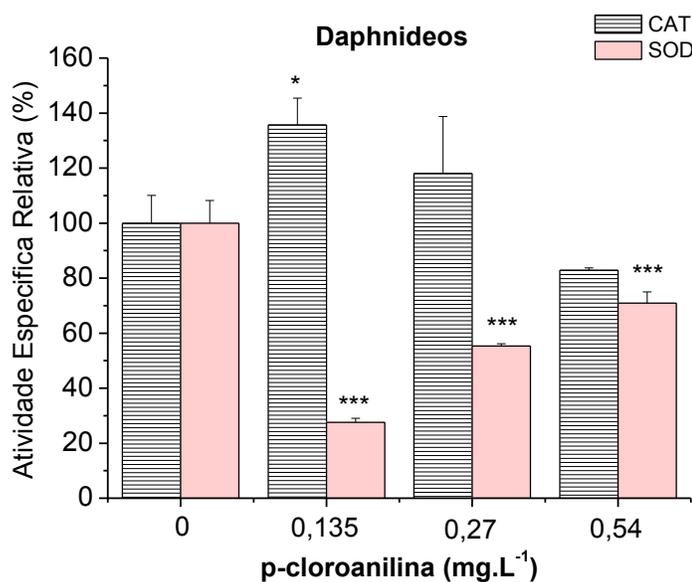


Figura 19. Efeito do PCA sobre a atividade das CAT e SOD de daphnias.

Os daphnídeos ($\pm 0,2g$) foram expostos ao PCA por 48 h e as atividades específicas relativas das enzimas antioxidantes foram determinadas. A atividade na ausência do composto foi considerada como controle (100%). *** ($p < 0.001$) e * ($p < 0.05$).

A concentração letal de DFB para os daphnídeos, ($0,018 \text{ mg.L}^{-1}$), não foi a que mais alterou a atividade das enzimas estudadas. Esta concentração alterou, significativamente, apenas a FAT. As enzimas dos microcrustáceos sofreram maior alteração nas suas atividades na concentração subletal do DFB, ($0,0045 \text{ mg.L}^{-1}$). Estes resultados concordam que os estudos de alterações a nível bioquímico são mais sensíveis para estudar os efeitos de DFB e PCA.

Apesar de o PCA ter sido menos tóxico que o DFB para os daphnídeos, no teste de toxicidade aguda, foi o composto que alterou significativamente as atividades das enzimas FAT e SOD destes organismos em todas as concentrações estudadas.

Não foram encontrados dados na literatura sobre a alteração das fosfatases, catalase e superóxido dismutase em organismos aquáticos expostos ao DFB e ao PCA.

O uso de fosfatases como indicadores da toxicidade de poluentes aos organismos aquáticos é relativamente recente, de modo que poucos relatos foram observados para o estudo com microcrustáceos.

Outro inseticida também usado na agricultura, o metilparathion, aumentou a atividade da fosfatase ácida do hepatopâncreas do crustáceo *Metapenaeus monóceros*. Porém a atividade da fosfatase alcalina destes foi reduzida (Reddy *et al.*, 1990).

As atividades *in vitro* das fosfatases em diferentes tecidos deste crustáceo foram diminuídas em todos os tecidos analisados, em diferentes concentrações do inseticida aldrin (Reddy *et al.*, 1991).

Daphnias juvenis expostas ao agroquímico paraquat tiveram aumento na atividade da SOD, nas concentrações mais baixa e mais alta do produto. Quando expostas a Cu^{2+} , não mostraram alteração na sua atividade. A atividade da CAT destes organismos aumentou significativamente quando expostas a Menadiona e paraquat, mas manteve-se inalterada em indivíduos expostos a Endosulfan. Em altas concentrações de cádmio, a atividade da CAT de daphnias diminuiu (Barata *et al.*, 2005).

Em analogia aos resultados obtidos com a SOD das daphnias expostas ao PCA estudos desenvolvidos por Otitoloju e Olagoke (2011), comprovaram a capacidade de inibição da catalase, superóxido dismutase e glutathione S-transferase do peixe *Clarias gariepinus*, expostas a produtos orgânicos como petróleo bruto, xileno, tolueno e benzeno. Estes autores recomendam a utilização dessas enzimas como marcadores de contaminação ambiental.

4.2.5 Análises enzimáticas dos fígados dos peixes expostos ao DFB

Os peixes foram expostos durante 96h a 100 mg.L^{-1} de DFB, composto que apesar de não ter causado mortalidade nos peixes, ocasionou alterações na atividade das enzimas CAT e SOD extraídas do fígado destes organismos. As fosfatases ácida e alcalina não apresentaram alterações significantes nas suas atividades (Figura 20).

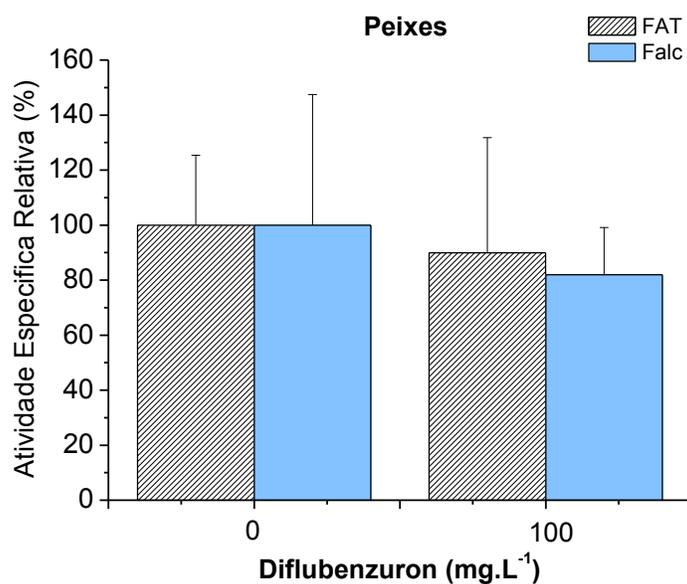


Figura 20. Efeito do DFB sobre a atividade das FAT e Falc do fígado dos peixes. Os peixes (n=10) foram expostos ao DFB por 96 h e as atividades específicas relativas das FAT e Falc foram determinadas.

Os peixes tiveram um aumento de 25% na atividade da CAT quando expostas a 100 mg.L⁻¹ do DFB. Entretanto, a SOD destes organismos sofreu um decréscimo, de aproximadamente 52%, na sua atividade para a mesma concentração do composto (Figura 21).

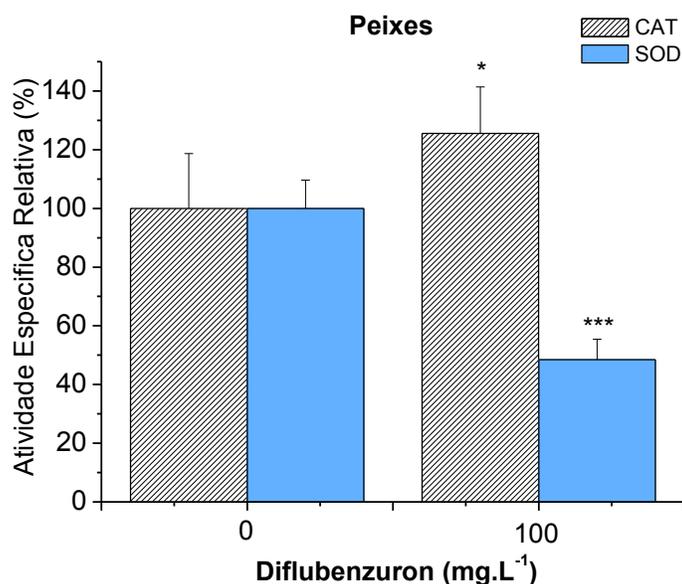


Figura 21. Efeito do DFB sobre a atividade das CAT e SOD do fígado dos peixes. Os peixes (n=10) foram expostos ao DFB por 96 h e as atividades específicas relativas da CAT e SOD foram determinadas. * Aumento significativo ($p < 0.05$) e *** $p < 0.001$.

4.2.6 Análises enzimáticas dos fígados dos peixes expostos ao PCA

Os peixes expostos ao PCA apresentaram aumento na atividade de suas enzimas, extraídas do fígado, para todas as concentrações do metabólito estudado. A FAT apresentou um aumento de 80, 248 e 512% na sua atividade e este aumento foi dose-dependente. A Falc teve aumento de 129, 112 e 130% para as respectivas concentrações testadas de PCA (Figura 22).

A CAT dos peixes tiveram um aumento significativo de 1467%, 943% e 560% para as respectivas concentrações do PCA. As concentrações de 12, 24 e 48 mg.L⁻¹ de PCA aumentaram a atividade da SOD em 1782, 1071 e 524%, respectivamente, em relação ao controle.

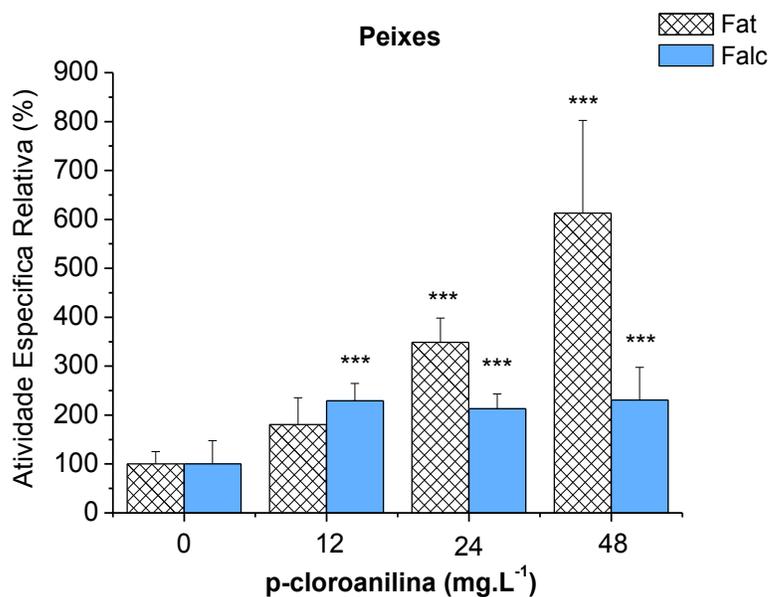


Figura 22. Efeito do PCA sobre a atividade das FAT e Falc do fígado dos peixes.

Os peixes (n=10) foram expostos ao PCA por 96 h e as atividades específicas relativas das FAT e Falc foram determinadas. Aumento significativo *** $p < 0.001$ em relação ao controle

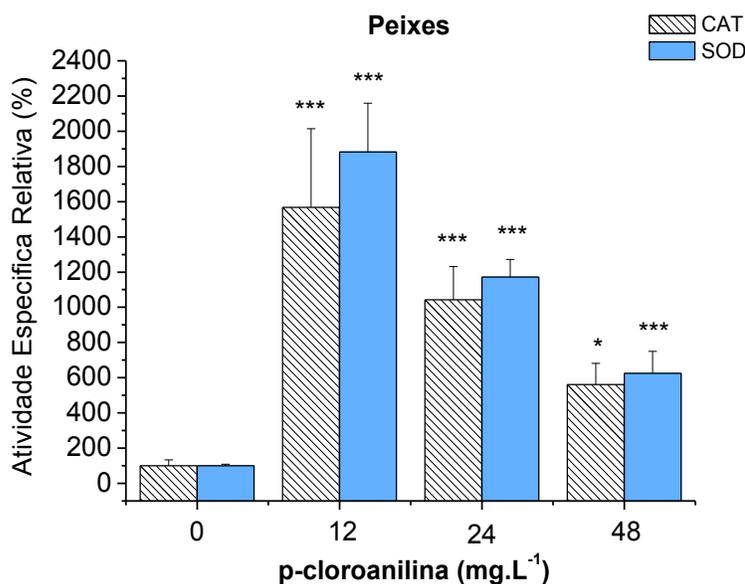


Figura 23. Efeito do PCA sobre a atividade das CAT e SOD do fígado dos peixes.

Os peixes (n=10) foram expostos ao PCA por 96 h e as atividades específicas relativas da CAT e SOD foram determinadas.* Aumento significativo ($p < 0.05$) e *** $p < 0.001$.

O DFB não foi tóxico para os peixes no teste de toxicidade aguda, onde 100 mg.L⁻¹ do composto foi testado. No entanto, esta concentração, nos testes bioquímicos, alterou a atividade das enzimas antioxidantes CAT e SOD. O metabólito PCA alterou, significativamente, a atividade das enzimas antioxidantes dos peixes na dose subletal (12 mg.L⁻¹). Estes resultados sugerem a ativação das vias de metabolização de xenobióticos, assim como das defesas antioxidantes, devido ao processo de metabolização do inseticida.

Alguns estudos já evidenciaram a capacidade de muitas substâncias químicas induzirem o estresse oxidativo em diferentes organismos, incluindo os peixes (Bagchi *et al.*, 1993; Hincal *et al.*, 1995).

Pereira e Martinez (2008), após a exposição do peixe *Prochilodus lineatus* por 6 h à concentração de 25 mg.L⁻¹ de DFB, observaram o aumento da catalase extraída do fígado.

Gabryelak e Kleot (1985) observaram aumento da CAT no fígado de carpas expostas ao paraquat e ao sedimento contendo hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH) e bifenilas policloradas (PCBs). A diminuição da SOD observada nos peixes expostos ao DFB está de acordo com relatos de inibição enzimática pelo excesso de agente estressor, o que supera a capacidade de resposta do organismo no equilíbrio de geração e consumo das espécies reativas do oxigênio (Krohling, 2010).

As fosfatases ácida e alcalina dos peixes expostos ao DFB não apresentaram alterações significativas. No entanto, o PCA aumentou a atividade destas enzimas no fígado dos peixes. Alterações nas atividades das FAT e Falc em diferentes tecidos podem ser resultantes de perturbações nas membranas celulares e de danos teciduais provocados por xenobióticos ou substâncias tóxicas (Molina *et al.*, 2005; Sancho *et al.*, 2009), ou ainda de atividade osteoblástica aumentada ou obstrução intra ou extra-hepática na passagem da bile (Jyothi e Narayan, 1999).

Venturini (2010) sugeriu que o aumento na atividade da FAT e Falc no fígado de pacus, expostos a concentração subletal do inseticida organofosforado Triclorfon, foi causado por um aumento na mobilização lisossomal e algum dano celular devido à toxicidade do composto.

Considerando-se que houve alterações nas fosfatases ácida e alcalina, avaliadas no fígado dos peixes expostos ao PCA por 96h, é plausível inferir que houve algum dano celular.

4.2.7 Considerações sobre alterações enzimáticas causadas aos organismos-teste pelo DFB e PCA

Nos testes *in vivo* as alterações enzimáticas causadas pelo DFB e PCA que foram significativas em relação ao controle para cada organismo-teste foram resumidas nas figuras 24 e 25.

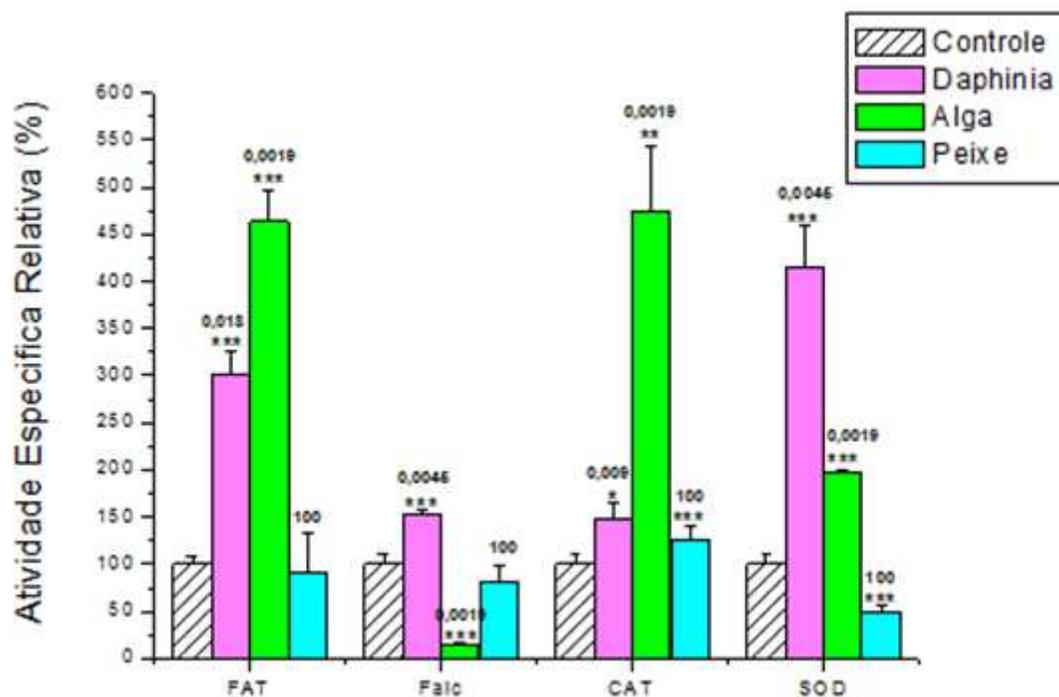


Figura 24. Alterações significativas na atividade das enzimas FAT, Falc, CAT e SOD de daphnias, algas e peixes expostos *in vivo* ao DFB.

Os valores acima das barras representam a concentração do DFB em mg.L^{-1} . * $p < 0.05$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

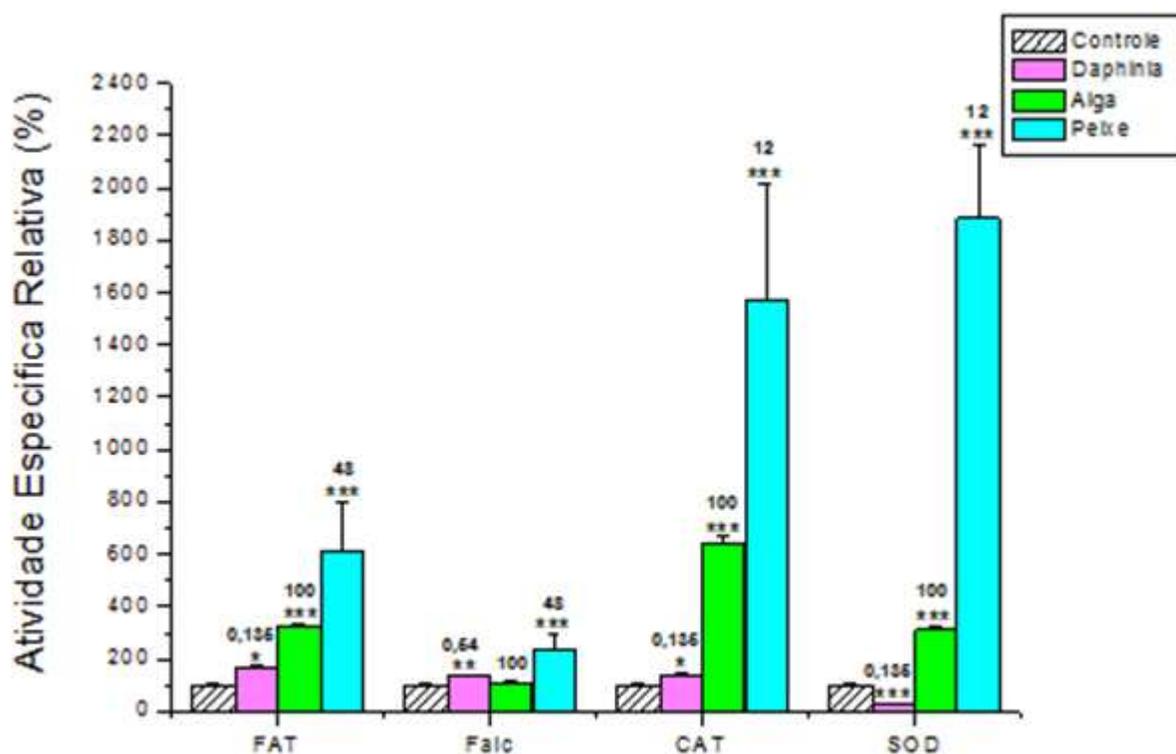


Figura 25. Alterações significativas na atividade das enzimas FAT, Falc, CAT e SOD de daphnias, algas e peixes expostos *in vivo* ao PCA.

Os valores acima das barras representam a concentração do PCA em mg.L^{-1} . * $p < 0,05$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

As enzimas estudadas nesta pesquisa foram facilmente quantificadas através de métodos de baixo custo, sensíveis a exposição *in vivo* aos compostos estudados e possuem significância toxicológica entre sua resposta e o impacto no organismo, características que preconizam vários estudos sobre indicadores ambientais (Van Der Oost *et al.*, 2003). Porém, não apresentaram um padrão de comportamento definido referente à dose de exposição onde a maior parte das enzimas estudadas não sofreram alterações enzimáticas dose-dependente. Outros estudos devem ser realizados a fim de verificar se em concentrações inferiores as que foram estudadas estas enzimas podem seguir um padrão de comportamento definido em relação à dose-resposta.

4.3 Estudos *in vitro*

Nos ensaios *in vitro* as enzimas FAT, Falc, CAT e SOD extraídas dos organismos-teste *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia similis* e *Oreochromis niloticus* foram previamente expostas com diferentes concentrações de DFB e PCA por 20 minutos, conforme item 3.7. Posteriormente, analisou-se o efeito desses compostos sobre a atividade das enzimas acima mencionadas.

4.3.1 Efeito *in vitro* dos compostos DFB e PCA sobre a atividade das enzimas FAT, Falc, CAT e SOD das amostras de fígado dos peixes.

Contrariamente aos estudos realizados *in vivo* no qual a maioria das enzimas apresentaram aumento em suas atividades, nos ensaios *in vitro*, somente as enzimas FAT e CAT extraídas do fígado de peixes e expostas ao PCA tiveram suas atividades significativamente ($p < 0.01$) inibidas em até 43% e 1,74%, respectivamente (Tabelas 6 e 7). A CAT apresentou redução de sua atividade em quase 100% com 0,78mM de PCA, enquanto a FAT foi inibida em 30% quando exposta pelo composto na mesma concentração, concluindo-se que a CAT mostrou-se mais sensível ao PCA em comparação com a FAT. As atividades relativas das enzimas FAT, Falc, CAT e SOD dos organismos-teste que não sofreram alterações mediante a exposição aos compostos *in vitro* podem ser visualizadas no Apêndice 6.

Tabela 6. Efeito *in vitro* dos compostos DFB e PCA sobre a atividade das enzimas FAT, Falc, CAT e SOD dos organismos-teste.

Organismo-teste	Composto	Enzima	Efeito na atividade
<i>Alga</i>	DFB	FAT	Inalterada
<i>Daphnia</i>		Falc	
<i>Peixe</i>		CAT	
		SOD	
<i>Alga</i>	PCA	FAT	Inalterada
<i>Daphnia</i>		Falc	
		CAT	
		SOD	
<i>Peixe</i>	PCA	FAT	Diminuição
		CAT	Diminuição
		Falc	Inalterada
		SOD	Inalterada

A alteração na atividade da FAT e CAT do fígado dos peixes foi dose-dependente, pois a atividade das enzimas foi reduzindo gradualmente com o aumento da concentração do PCA (Tabela 7). A partir dos valores de atividade enzimática obtidos, determinou-se a concentração do composto que reduziu a atividade das enzimas FAT e CAT em 50% (CI50). O valor de CI50, por sua vez, foi utilizado para se obter a constante de inibição (Ki) e o tipo de inibição.

Tabela 7. Atividade das enzimas FAT e CAT do fígado dos peixes, na presença de diferentes concentrações de PCA.

A atividade na ausência do composto foi considerada como controle (100%).

Enzima	Composto	Concentração (mM)	Atividade Relativa (% + d.p.)
FAT	PCA	0,39	79,11 ± 2,45
		0,78	72,16 ± 1,94
		1,56	59,26 ± 0,52
		3,12	51,39 ± 3,10
		6,24	43,16 ± 1,03
CAT	PCA	0,078	100,09 ± 9,45
		0,19	66,49 ± 7,29
		0,39	31,65 ± 7,14
		0,78	1,74 ± 0,024

A atividade na ausência do composto foi considerada como controle (100%).

A maioria dos trabalhos sobre o efeito de agentes tóxicos em fosfatases ácidas e catalase de peixes relatam estudos *in vivo* com poluentes orgânicos e metais, existindo uma carência de trabalhos *in vitro*, principalmente com os compostos DFB e PCA. Portanto, os resultados obtidos neste trabalho serão comparados levando em consideração pesquisas que relacionam testes *in vitro* com as enzimas FAT e CAT em diversos organismos expostos a uma grande variabilidade de compostos orgânicos.

Assim, em analogia com os resultados obtidos no teste *in vitro* com PCA e a FAT de peixes, Strmac (2000) verificou a diminuição da atividade desta enzima, extraída de hepatócitos isolados da espécie de peixe *O. mykiss*, quando exposta *in vitro* a mistura de pesticidas, bifenilas policloradas e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. El-Demerdash (2011), constatou uma diminuição da atividade das enzimas CAT e FAT extraídas do fígado de ratos que foram incubadas a 37 °C com inseticidas piretróides e organofosforados. Neste estudo constatou-se que as enzimas CAT e FAT podem ser consideradas boas biomarcadoras e serem utilizadas para monitoramento de áreas contaminadas por estes inseticidas. Alicigüzel *et. al.*, (2001) estudaram o efeito *in vitro*

do herbicida ácido 4-clorofenoxiacético (4-CPA) em várias enzimas antioxidantes de eritrócitos humanos e constataram que 1ppm do herbicida foi capaz de reduzir significativamente ($P < 0,001$) a atividade da catalase.

4.3.2 Determinação da CI50 e das constantes cinéticas para as enzimas FAT e Falc de fígado de peixe sob a ação do PCA.

Para se calcular o valor de CI50, a inibição da enzima foi avaliada para várias concentrações de PCA e os dados obtidos foram ajustados por regressão não linear que gerou uma curva tipo log-x ($y = a_1 + (a_2 - a_1) / (1 + 10^{((\text{LOG}x - x) * p)})$) (Figuras 26 e 27). Os valores de CI50 e seus intervalos de confiança 95% foram 3,2 (3,12 - 3,33) e 0,20 (0,16 - 0,24) mM, respectivamente, para FAT e CAT. O valor de CI50 foi utilizado para delinear os experimentos *in vitro* para obtenção das constantes K_m e K_i .

Para a determinação das constantes de inibição do PCA para FAT e CAT, o composto foi mantido em duas concentrações diferentes, baseadas na CI50 obtida para cada enzima, enquanto que a concentração dos substratos pNPP e H_2O_2 foi variada, permitindo a medida da atividade com o aumento da concentração de substrato na ausência e presença do inibidor. Os dados obtidos foram utilizados para gerar os gráficos de Michaelis-Menten e Lineweaver-Burk, as constantes K_m , K_i e a Velocidade máxima da reação (V_{max}) (Figuras 28 a 31). O gráfico de Lineweaver-Burk para FAT foi consistente com uma inibição do tipo competitiva onde o valor de K_i obtido foi de 8,2 mM e o valor de K_m 0,21 mM (Figuras 28 e 29). Isto infere que a enzima FAT tem uma afinidade com o substrato pNPP cerca de 40 vezes maior do que com o inibidor PCA. Neste tipo de inibição, a ação catalítica é reduzida devido à diminuição da proporção de moléculas de enzima que se ligam ao substrato em função do tempo.

Com relação à CAT, o gráfico dos duplos recíprocos mostrou tratar-se de uma inibição não competitiva e os valores de K_i e K_m obtidos foram 0,030mM e 56,3 e respectivamente (Figura 30 e 31). A partir dos valores de IC50 e K_i determinados para FAT e CAT, pode-se constatar que o PCA foi um agente inibidor mais potente para a CAT. Este apresentou o menor valor de K_i , da ordem de 274 vezes inferior ao obtido para FAT, mostrando que o PCA pode se ligar fortemente à CAT, diminuindo a

velocidade máxima da ação enzimática por reduzir a concentração total de enzima ativa.

Dantzger (2010), em experimentos *in vitro* onde a FAT de *Daphnia similis* foi incubada com metais e poluentes orgânicos, a FAT sofreu inibição competitiva ($K_i = 0,010$ mM e $CI_{50} = 0,289$ mM) com o poluente Alquil benzeno sulfonato linear (LAS) e inibição não competitiva para o metal Hg^{2+} ($K_i = 0,0365$ mM e $IC_{50} 0,085$ mM).

Nos testes *in vitro*, as enzimas FAT, Falc, CAT e SOD de todos os organismos-teste foram insensíveis ao DFB e ao PCA, com excessão da FAT e CAT dos peixes, enquanto nos testes *in vivo* a maioria destas enzimas sofreram alterações em suas atividades para ambos os compostos. No entanto, o teste *in vitro* foi importante, pois permitiu fornecer informações sobre a interação enzima-poluente. Isto contribui para a elucidação do mecanismo de ação do PCA sobre as enzimas FAT e CAT dos peixes.

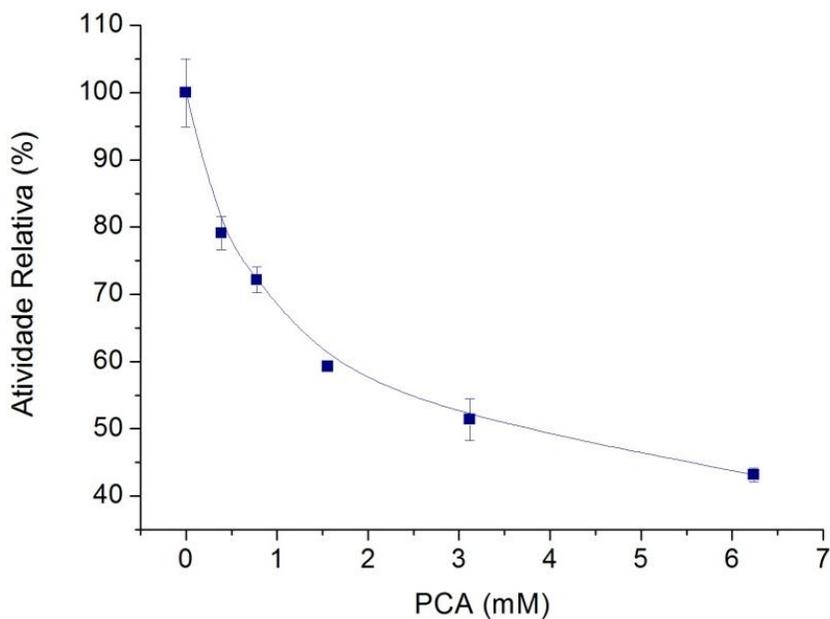


Figura 26. Efeito da concentração do PCA sobre a atividade da enzima FAT do fígado dos peixes.

A atividade enzimática foi determinada por incubação da enzima (40 min, 37 °C), conforme especificado em Métodos, em presença de diferentes concentrações de PCA, utilizando-se pNPP como substrato. A hidrólise do substrato na ausência do composto foi considerada como 100%, e os demais valores como porcentagens deste valor. Os resultados estão expressos como média \pm DP de, no mínimo, três experimentos realizados em triplicata.

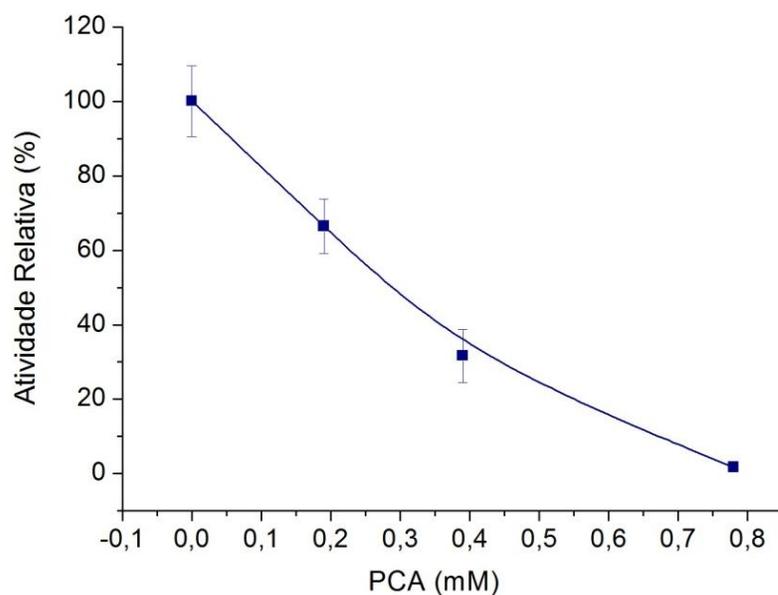


Figura 27. Efeito da concentração do PCA sobre a atividade da enzima CAT do fígado dos peixes.

A atividade enzimática foi determinada, conforme especificado em Métodos, em presença de diferentes concentrações de PCA, utilizando-se H_2O_2 como substrato. A degradação do substrato na ausência do composto foi considerada como 100%, e os demais valores como porcentagens deste valor. Os resultados estão expressos como média \pm DP de, no mínimo, três experimentos realizados em triplicata.

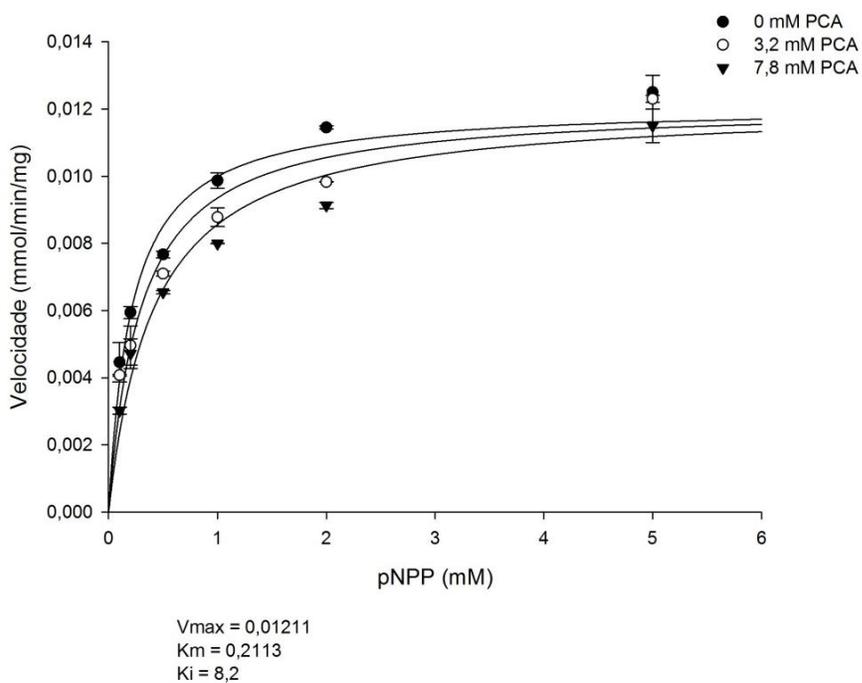


Figura 28. Determinação de Km, Ki e Vmax da fosfatase ácida do fígado de peixes através do gráfico de Michaelis-Menten.

A velocidade máxima (Vmax) foi calculada pela produção de pNP em amostras incubadas durante 40 minutos a 37 °C.

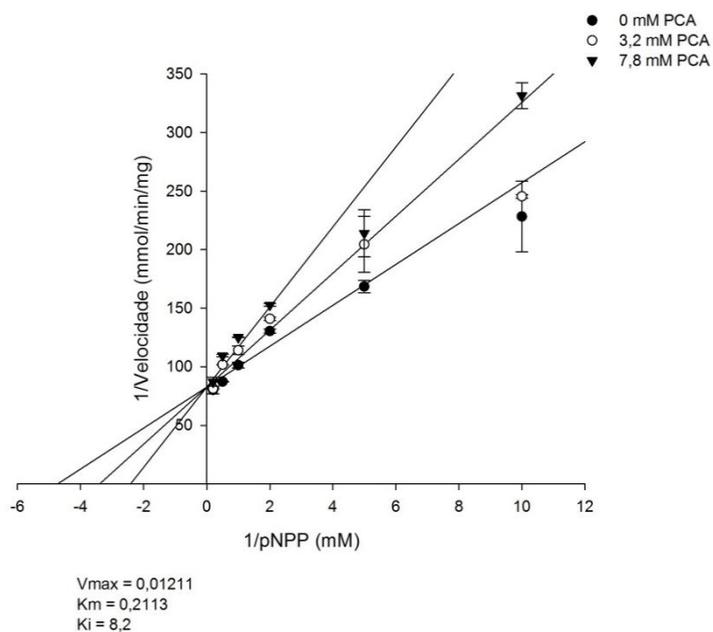


Figura 29. Determinação de K_m , K_i e V_{max} da fosfatase ácida do fígado de peixes através do gráfico de Lineweaver-Burk.

A velocidade máxima (V_{max}) foi calculada pela produção de pNP em amostras incubadas durante 40 minutos a 37 °C.

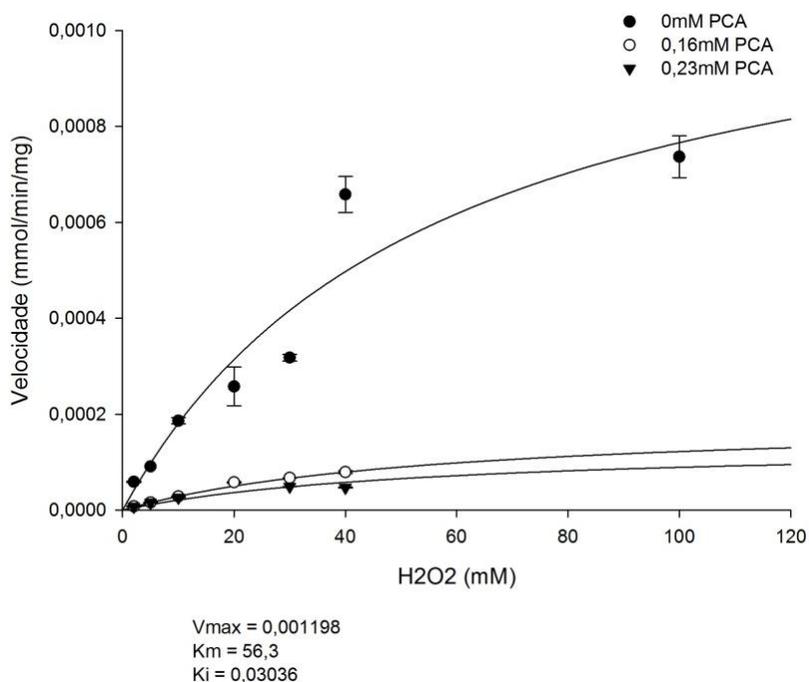


Figura 30. Determinação de K_m , K_i e V_{max} da Catalase do fígado de peixes através do gráfico de Michaelis-Menten.

A velocidade máxima (V_{max}) foi calculada pela degradação de H_2O_2 por minuto.

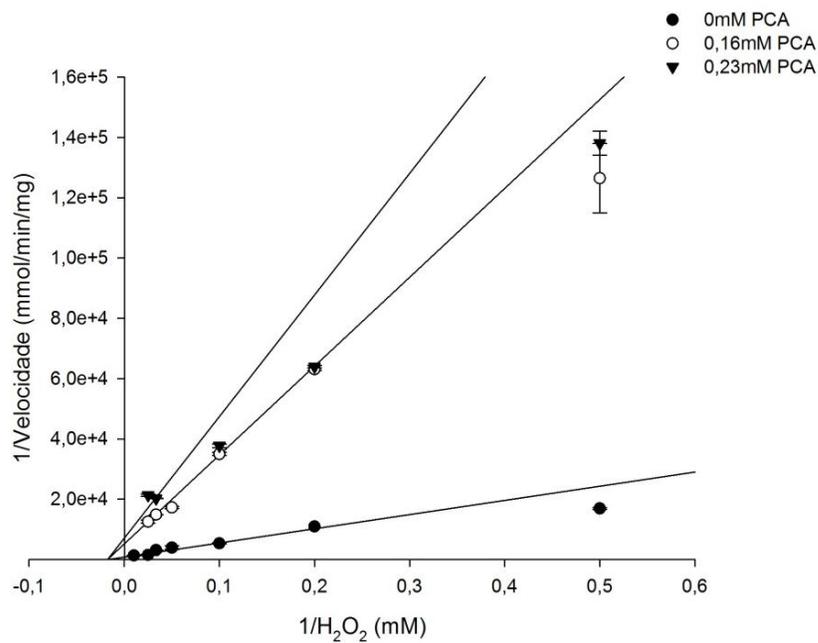


Figura 31. Determinação de K_m , K_i e V_{max} da Catalase do fígado de peixes através do gráfico de Lineweaver-Burk.

A velocidade máxima (V_{max}) foi calculada pela degradação de H_2O_2 por minuto.

5 – CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, concluiu-se que:

- Nos testes de toxicidade aguda, ambos os compostos apresentaram toxicidade aos organismos-teste, sendo que o DFB apresentou maior toxicidade para as algas (*Pseudokirchneriella subcapitata*) e os microcrustáceos (*Daphnia similis*), e o seu metabólito p-cloroanilina (PCA) para os microcrustáceos e os peixes (*Oreochromis niloticus*) Esses resultados podem delinear futuros estudos crônicos, estudos de bioconcentração e ainda serem utilizados em caráter imediato para o estabelecimento de limites máximos permissíveis destes compostos nos corpos hídricos.

- Nos ensaios *in vivo* as enzimas FAT, Falc, CAT e SOD dos organismos-teste foram mais sensíveis às alterações na sua atividade mediante a exposição aos compostos DFB e PCA que nos ensaios *in vitro*, onde apenas as enzimas FAT e CAT dos peixes foram sensíveis à exposição ao PCA. Portanto há indícios de que essas enzimas quando analisadas *in vivo* podem ser utilizadas como indicadoras da presença de DFB e PCA no ambiente aquático. No entanto, os testes *in vitro* foram importantes, pois forneceram dados, escassos na literatura, referentes à ação *in vitro* do PCA sobre a FAT e CAT extraídas dos peixes. Estes organismos são direta e indiretamente afetados pela exposição ao PCA.

- A importância desta pesquisa reside em que os resultados obtidos preencheram, em parte, uma lacuna existente na literatura científica a respeito do impacto ambiental em organismos não-alvo de um inseticida de uso frequente e não registrado na piscicultura, DFB, e de seu metabólito PCA, do qual pouco se conhece sobre sua interação com o ambiente aquático. Soma-se a isso o fato de fornecer dados sobre a ação desses compostos em marcadores bioquímicos comumente utilizados. Os resultados serão de importância para o suporte tanto a programas ambientais de melhorias para áreas de pisciculturas como para órgãos governamentais reguladores, além de fornecer dados científicos para trabalhos posteriores sobre o assunto, beneficiando assim diversos setores da iniciativa pública e privada que atuam nesta área.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe, T.; Saito, M.; Niikura, Y.; Shigeoka, T.; Nakano, Y. Embryonic development assay with *Daphnia magna*: Application to toxicity of aniline derivatives, *Chemosphere*. 45: 487-495, 2001.

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR12713: Ecotoxicologia aquática ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR12713: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia* spp (Crustacea, Cladocera), 2004.

Adams, S.M. Biological Indicators of Aquatic Ecosystem Stress. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, 2002.

Aebi, H. E. Catalase. In; Bergmeyer, H. U. Methods of Enzymatic Analysis. Vol III, 3th ed. Verlagchemie Gmbh, Weinheim, 1983.

Allan, I.J.; Vrana, B.; Greenwood, R.; Mills, G.A.; Roig, B.; Gonzales, C. A “toolbox” for biological and chemical monitoring requirements for the European Union's Water Framework Directive. *Talanta* 69: 302–322, 2006.

Aliciguzel, Y.; Ozdem, S.; Demir, A. Y.; Unal, F.; Kumbul, D.; Ozdem, S. S.; Perry, G.; Smith, M. A. Effect of the herbicide 4-CPA on erythrocyte antioxidant enzymes in vitro. *Redox Rep.* 6(3), p. 153-4, 2001.

Amorim, L. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, São Paulo, v. 6, Supl. 1, p. 1-13, 2003.

Antia, N. J., P. J. Harrison, D. S. Sullivan, and T. Bisalputra. Influence of the insecticide diflubenzuron (dimilin) on the growth of marine diatoms and a harpacticoid copepod in culture. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 42: p. 1272-1277, 1985.

Aoyama, H., Silva, T.M.A., Miranda, M.A., Ferreira, C.V. Proteínas tirosina fosfatases: propriedades e funções biológicas. *Quim Nova*. 26: 896-900, 2003.

Araujo, G. M.; Silva, C. B.; Hasson-Voloch, A.; Int. J. Biochem. Cell Biol. p. 28-91,1996.

Arias, A. R. L.; Buss, D. F.; Alburquerque, C.; Inácio, A. F.; Freire, M. M.; Egler, M.; Mugnai, R.; Baptista, D. F. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. Ciência & Saúde Coletiva, Rio de Janeiro, v. 12, n. 1, p. 61-72, 2007.

Bachir, F.; Loppes, R. Identification of new derepressible phosphatase in *Chlamydomonas reinhardtii*. FEMS Microbiol. Lett. 149: 195-200, 1997.

Bagchi, M.; Hassoun, E.A.; Akubue, P.; Bagchi, D.; Stohs, S.J. Comparative effects of endrin on hepatic lipid peroxidation and DNA damage, and nitric oxide production by peritoneal macrophages from C57BL/6J and DBA/2 mice. Comp. Biochem. Physiol. C, New York ,v.105, p.525-529, 1993.

Balint, T.; Ferenczy, J.; Katai, F.; Kiss, I.; Kraczer, L.; Kufesak, O.; Lang, G.; Polyhos, C.; Szabo, I., Szegletes, T.; Nemcsok, J. Similarities and differences between the massive (*Anguilla anguilla* L.) devastations that occurred in Lake Balaton in 1991 and 1995. Ecotoxicol. Environ. Saf. 37: 17-23, 1997.

Basso, L.J.; Nieto, R.; Tremaroli, D. Implementação de testes de toxicidade para o controle de efluentes líquidos. CETESB, São Paulo. Série Manuais/Secretaria do Meio Ambiente. p. 7, 1990.

Barata, C., Varo, I., Navarro, J.C., Arun, S., Porte, C. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. Comp. Biochem Physiol. C 140: 175-186, 2005.

Barros, L.S.S.; Amaral, L.A.; Lorenzon, C.S. *Daphnia magna* – bio-indicator of pollution from poultry and pig abattoir effluents. Rev. Bras. Saúde 8: 217-228, 2007.

Bhavan, P. S.; Geraldine, P.; J. Environ. Biol. p. 25- 213, 2004.

Boavida, M.J.; Heath, R.T. Are the phosphatases released by *Daphnia magna* components of its food? Limnol. Oceanogr. 29: 641-645, 1984.

Booth GM, Ferrell D. Degradation of dimilin by aquatic food webs. *Environmental Science Research*, 10: p.221-243, 1977.

Boyd, C. E.; Massaut, L. Risk associated with the use of chemicals in pond aquaculture. *Aquacultural Engineering*, 20: p.113-132. 1999.

Bounias, M.; Kruk, I.; Nectoux, M.; Popeskovic, D.; *Ecotoxicol. Environ. Saf.* p. 35 – 67, 1996.

Brasil. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA. Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011. *Diário Oficial da União*, Brasília, 16 de maio de 2011.

Braten, T. (1975) Ultrastructural localization of phosphohydrolases in gametes, zygotes and zoospores of *Ulva mutabilis* FoYN. *J. Cell. Sci.* 17: 647-653, 1975.

Brooks, J.L. Cladocera. In: Edmondson, W.T. (ed.). *Fresh water biology*. New York: John Wiley & Sons, Inc. 1247p. (2 ed.), 1959.

Bua. OH-radicals in the troposphere — Concentration level and consequences. Weinheim, VCH, p. 163, 1995, (BUA Report 100).

Burka, J.F.; Hammel, K.L.; Horseberg, T.E.; Johnson, G.R.; Rainnie, D.J.; Speare, D.J. Drugs in salmonid aquaculture – A review. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, :20, p. 333-349, 1997.

Campos, J. L. A falta de produtos registrados para uso em aquicultura no Brasil – Uma brecha para a imposição de barreiras comerciais e risco para os consumidores. *Panor. Aqüic.*, Rio de Janeiro, Jan-Fev 2005.

CETESB Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Água - teste de toxicidade aguda com *Daphnia similis* Claus, 1876 (Cladóceras, Crustácea): Método de ensaio. p. 25, 1994.

CETESB Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Considerações preliminares sobre toxicidade aos organismos aquáticos. São Paulo: CETESB, p.11, 1990.

CETESB Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Relatório da Qualidade das Águas Interiores, 2007. Disponível em: <www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/publicações.asp>. Acesso em 15 fev. 2011.

Chen, Q.X.; Zheng, W.Z.; Lin, J.Y.; Shi, Y.; Xie, W.Z.; Zhou, H.M. Effect of metal ions on the activity of green crab (*Scylla serrata*) alkaline phosphatase. Intern. J. Biochem. Cell Biol. 32: 879-885, 2000.

Collen, J.; Pinto, E.; Pedersen, M.; Colepicolo, P. Induction of oxidative stress in the red macroalga *Gracilaria tenuistipitata* by pollutant metals. Arch. Environ. Contamin. Toxicol. 45: p. 337-342, 2003.

Cooper, A.; Bowen, I.D.; Lloyd, D. The properties and subcellular localization of acid phosphatases in the colourless alga, *Polytomella caeca*. J. Cell. Sci. 15: 605-618, 1974.

Coquart, V.; Hennion, M. C. Trace level monitoring of chloroanilines in environmental waters using online trace-enrichment and liquid chromatography with UV and eletrochemical detection. Chromatographia, 37, p. 392-398, 1993.

Cunningham, P. A. A review of toxicity testing and degradation studies used to predict the effects of diflubenzuron (dimilin) on estuarine crustaceans. Environmental Pollution 40A: p.63-86, 1986.

Dantzger, M. Fosfatases de *Daphnia similis* como biomarcadores da ecotoxicidade de agroquímicos. Tese de Mestrado em Biologia Funcional e Molecular. Instituto de Biologia, UNICAMP, 2010.

Das, K.C., Lewis-Molock, Y., White, C.W. Thiol modulation of TNF- α and IL-1 induced MnSOD gene expression and activation of NF-kappa β . Mol. Cell. Biochem. v. 148, p. 45- 57, 1995.

Dekinkelin. P., Michel, C.H. Ghittino, P. Precis de Pathologie des poisons. Paris: Institut National de La Recherche Agronomique, Office International des Épizooties, p. 348, 1985.

Diamantino, T.C.; Guilhermino, L.; Almeida, E.; Soares, A.M.V.M. Toxicity of sodium molybdate and sodium dichromate to *Daphnia magna* Straus evaluated in acute,

chronic, and acetylcholinesterase inhibition tests. *Ecotoxicol. Environm Saf.* 45: p. 253-259, 2000.

Domozych, D.S. The endomembrane system and mechanism of membrane flow in the green alga, *Gloeomonas kupfferi* (Volvocales, Chlorophyta) II. A cytochemical analysis. *Protoplasma* 149: 108-119, 1989.

Draredja, B. H.; Soltani, N. Effects of diflubenzuron on growth and glutathione in mosquito fish (*Gambusia affinis*). *Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwkd Toegep Biol Wet*, 66, p.857-62, 2001.

Ebert D. Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in Daphnia [Internet]. Bethesda (MD):National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information, 2005. Disponível em: <http://ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Books>. Acesso em: 23 ago 2012.

El demerdash, F.M.; Elagamy, E.I. Biological effects in Tilapia nilotica fish as indicators of pollution by cadmium and mercury. *Int. J. Environm. Health Res.* 9: 173-186, 1999.

El-Demerdash, F. M. Oxidative Stress and hepatotoxicity induced by synthetic pyrethroids - organophosphate insecticides mixture in rat. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* Apr;29(2):145-58, 2011.

Eler, M.N.; Espíndola, E.L.; Espíndola, E.A. Avaliação sócio-econômica dos empreendimentos de pesquepague. In: Avaliação dos impactos de pesque-pague: Uma análise da atividade na bacia hidrográfica do rio MogiGuaçu. Eler, M.N. Espíndola (org.). São Carlos: Rima. p. 31-75, 2006.

El Enany, A.E.; Issa, A. A. Proline alleviates heavy metal stress in *Scenedesmus armatus*. *Folia Microbiologica* 46: p. 227-230, 2001.

Elsebae, A. A. Enzyme activity as a biomarker for shrimp and artemia exposure to insecticides. *Alex. Sci. Exch.* p. 17- 417, 1996.

Environmental Protection Agency (EPA). Tolerances and exemptions from tolerances for pesticide chemicals in or on raw agricultural commodities; diflubenzuron. *Federal Register* 44(85):25452-25454, 1979.

Fathi, A. A. Toxicological response of the green alga *Scenedesmus bijuga* to mercury and lead. *Folia Microbiol.* p. 47- 667, 2002.

Fernández-Casalderrey, A.; Ferrando, M.D.; Andreu-Molinder, E. Effect of sublethal concentrations of pesticides on the feeding behavior of *Daphnia magna*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v.27, p.82-89, 1994.

Ferreira, C.V.; Granjeiro, J.M.; Taga, E.M.; Aoyama, H. Purification and characterization of multiple forms of soybean seed acid phosphatases. *Plant Physiol. Biochem.* 36: 487-494, 1998.

Food And Agriculture Organization, FAO. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Rome: Departamento de pesca de la FAO, 2007.

Food and Agriculture Organization, FAO. Specifications and Evaluations for Agricultural Pesticides. Evaluation Report on Diflubenzuron, 2004.

Fridovich, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* v. 64, p. 97-112, 1995.

Fujimoto, R.Y.; Martins, M.L.; Moraes, F.R.; Onaka, E.M. Utilização do diflubenzuron no controle de crustáceos parasitos de piauçu, *Leporinus macrocephalus*. Efeitos paraticida e parâmetros hematológicos. *Anais do XI Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária*, p.133, 1999.

Galeb, L. A. G. Avaliação dos efeitos toxicológicos da deltametrina em uma espécie de peixe fluvial nativo jundiá (*Rhamdia quelen*). Curitiba, 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, 2010.

Gabryelak, T.; KleoT, J. The effect paraquat on the peroxide metabolism enzymes in erythrocytes of freshwater fish species. *Comp. Biochem. Physiol C, New York*, v.81, p.415-418. 1985.

Geoffroy, L.; Teisseire, H.; Couderchet, M.; Vernet, G. Effect of oxyfluorfen and diuron alone and in mixture on antioxidative enzymes of *Scenedesmus obliquus*. *Pest. Biochem. Physiol.* 72: 178-185, 2002.

Geraldine, P.; Bhavan, P. S.; Kalamurthy, J.; Zayapragassarazan, Z.; J. Environ. Biol. p. 20-141, 1999.

Gherardi-Goldstein, E.; Bertoletti, E.; Zagatto, P.A.; Araujo, R.P.A.; Ramos, M.L.L.C. Procedimentos para a utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos. CETESB, São Paulo. Série Manuais/Secretaria do Meio Ambiente. p. 17, 1990.

Gill, T.S.; Pande, J.; Pewari, H. Enzyme modulation by sublethal concentrations of aldicarb, phosphamidon, and endosulfan in fish tissues. Pest. Biochem. Physiol. 38: 231-244, 1990.

Gill, T. S.; Tewari, H.; Pande, J. *In vivo* and *in vitro* effects of cadmium on selected enzymes in different organs of the fish *Barbus conchoni* Ham.; Comp. Biochem. Physiol. C. p.100- 501. 1991.

Gill, T.S., Tewari, H.; Pande, J. Short and long effects of copper on the rosbay barb (*Puntius conchoni* Ham.). Ecotoxicol. Environ. Saf. 23: 294-306, 1992.

Granjeiro, J.M.; Ferreira, C.V.; Jucá, M.B.; Taga, E.M.; Aoyama, H. Bovine kidney low molecular weight acid phosphatase: FMN – dependent kinetics. Biochem. Mol. Biol. Int., 41: 1201-1208, 1997.

Granjeiro, P.A.; Ferreira, C.V.; Granjeiro, J.M.; Taga, E.M.; Aoyama, H. Purification and kinetic properties of a castor bean seed acid phosphatase containing sulfhydryl groups. Physiol. Plant. 107: 151-158, 1999.

Hartree, E.F. Determination of proteins: a modification of the Lowry method that give a linear photometric response. Anal. Biochem., 48: 422-427, 1972.

Heinz Streble, Dieter Krauter . Atlas de los microorganismos de agua Dulce. Omega, Barcelona, 1987.

Hibiya, T. An atlas of fish histology, normal and pathological features. New York: Gustav Fischer Verlag, 1982.

Hincal, F.; Gurbay, A.; Giray, B. Induction of lipid peroxidation and alteration of glutathione redox status by endosulfan. *Biol. Trace Elem. Res.*, Clifton, v.47, p.321-326, 1995.

Holcombe, G.W., Benoit, D.A., Hammermeister, D.E., Leonard, E.N., and Johnson, R.D., Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 28:287–297, 1995.

Horst, M. N. The biosynthesis of crustacean chitin by a microsomal enzyme from larval brine shrimp. *Journal of Biological Chemistry* 256: 1412-1419, 1981.

Hutchinson, T.H., Shillabeer, N., Winter, M.J; Pickford, D.B. Acute and chronic effects of carrier in aquatic organisms: a critical review. *Aquat. Toxicol.* 76:69-92, 2006.

IBAMA Manual de testes para a avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos. Secretaria do Meio Ambiente. Brasília. p. 351, 1988.

Jin-Clark, Y.; Lydy, M.J.; Zhu, K.Y. Effects of atrazine and cyanazine on chlorpyrifos toxicity in *Chironomus tentans* (Diptera: *Chironomidae*). *Environ. Toxicol. Chem.* 21: 598-603, 2002.

Jonsson, C.M.; Maia, A.H.N.; Ferreira, C.J.A.; Ribeiro, E.O. Risk assessment of the herbicide clomazone in the aquatic life. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 26: 1724 – 1726, 1998.

Jonsson, C.M.; Maia, A. H. N. Protocolo de avaliação de agentes microbianos de controle biológico de pragas para registro como biopesticidas. III. Testes em organismos não alvo do ambiente aquático. Embrapa Meio Ambiente. Serie Documentos. p. 33, 1999.

Jonsson, C.M.; Ferracini, V.L.; Paraiba, L.C.; Rangel, M; Aguiar, S.R. Alterações bioquímicas em pacus (*Metynnis argenteus*) expostos ao paclobutrazol. *Scientia Agri.* 59: 441-446, 2002.

Jonsson, C.M. Fosfatase ácida da microalga *Selenastrum capricornutum* : extração, caracterização e efeito de poluentes de origem agrícola. Tese de Doutorado em Biologia Funcional e Molecular. Instituto de Biologia, UNICAMP, 2005.

Jonsson, C.M., Aoyama, H. *In vitro* effect of agriculture pollutants and their joint action on *Pseudokirchneriella subcapitata* acid phosphatase. *Chemosphere* 69: 849-855, 2007.

Jonsson, C.M., Paraiba, L.C, Aoyama, H. Metals and linear alkylbenzene sulphonate as inhibitors of the algae *Pseudokirchneriella subcapitata* acid phosphatase activity. *Ecotoxicology* 18: 610-619, 2009.

Julin, A.M.; Sanders, H.O. Toxicity of the IGR, diflubenzuron, to freshwater invertebrates and fishes. *Mosquito News*. 38(2): 256–259, 1978.

Jyothi, B., Narayan, G. Certain pesticide-induced carbohydrate metabolic disorders in the serum of freshwater fish *Clarias batrachus* (Linn.) *Food Chem. Toxicol.* N.37, p.417-421, 1999.

Kataoka, H. Derivatization reactions for the determination of amines by gas chromatography and their applications in environmental analysis. *J. Chromatogr. A.*, 733, 19-34, 1996.

Kasai, F., Hatakeyama, S. Herbicide susceptibility in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Selenastrum capricornutum*. *Chemosphere* 27: 899-904, 1993.

Keddy, C.J.; Greene, J.C.; Bonnel, M.A . Review of whole-organism bioassay: soil, freshwater, sediment, and freshwater assessment in Canada. *Ecotoxicol. Environm. Saf.* 30: 221-251, 1995.

Khangarot, B.S.; Rathore, R.S. Effects of copper on respiration, reproduction, and some biochemical parameters of water flea *Daphnia magna* Straus. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 70: 112-117, 2003.

Kim, J.; Kim, S.; K.W.; Choi, C.Y.; Lee, S.; Choi, K. Molecular cloning of *Daphnia magna* catalase and its biomarker potential against oxidative stresses. *Comp Biochem Physiol C.Sep*;152, 263-269, 2010.

Konnecker, G.; Boehncke, A.; Schmidt, S. Ecotoxicological assessment of p-chloroaniline fate and effects in aquatic systems. *Fresenius Environmental Bulletin*. Vol 12, nº6 p- 589-593, 2003.

Kong, F.X.; Hu, W.; Liu, Y. Molecular structure and biochemical toxicity of four halogeno-benzenes on the unicellular green alga *Selenastrum capricornutum*. Environ. Exp. Bot. 40: 105-111, 1998.

Kubitza, F.; Kubitza, L.M.M. Principais parasitoses e doenças dos peixes cultivados. 3. ed. Jundiaí: Copyright, p. 96, 1999.

Krohling, C. A. Efeito de inseticidas nos aspectos enzimáticos e fisiológicos em plantas de café Conilon (*Coffea canephora*) e na microbiota do solo. Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ecossistemas Dissertação de Mestrado Centro Universitário Vila Velha-ES, 2010.

Kruskopf, M. M.; Du Plessis, S. Induction of both acid and alkaline phosphatase activity in two green-algae (*chlorophyceae*) in low N and P concentrations. Hydrobiologia 513: 59-70, 2004.

Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 277: 680-685, 1970.

Lee, R.E. Phycology. Cambridge University Press, Cambridge, p. 645, 1989.

Lespilette, M.; Bogé, G.; Richard, S.; Jamet, J.L. Origin and characteristics of the zooplankton phosphatase activity in a coastal ecosystem of the Mediterranean sea (Toulon Bay). Marine Environ. Res. 63: 445-456, 2007.

Lineweaver, H., Burk, D. The determination of enzyme dissociation constants. J. Am. Chem. Soc., 56: 658-666, 1934.

Lopes, R. B. Análise ecotoxicológica dos xenobióticos triclofon ediflubenzuron empregados na aquicultura continental. Tese de Doutorado em Ciências. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

Mabilia, R. G; Souza, S. M. G; Schiffino, L. Uso do Diflubenzuron na aquicultura no tratamento de ectoparasitoses – restrições de uso. In: Congresso Estadual de Medicina Veterinária, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, 2004.

Machado, J.; Coimbra, J.; Castilho, F.; As, C. Effects of diflubenzuron on shell formation of the freshwater clam, *Anodonta cygnea*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 19:35-39, 1990.

Maduenho, L.P., Mendes, J.P., Martinez, C.B.R. Efeitos agudos do inseticida dimilin em parâmetros histológicos do peixe *Prochilodus lineatus*. Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil, 23 a 28 de Setembro de 2007, Caxambu – MG.

Mangas-Ramírez, E.; Sarma, S.S.S.; Nandini, S. Combined effects of algal (*Chlorella vulgaris*) density and ammonia concentration on the population dynamics of *Ceriodaphnia dubia* and *Moina macrocopa* (Cladocera). Ecotoxicol. Environ. Saf.,v.51, p.216-222, 2004.

Marillis, S.; Monika, M.; Kahru, A.; Blinov, I., Toxicity of five anilines to crustaceans, protozoa and bacteria. J. Serb. Chem. Soc. 75 (9) 1291–1302, 2010.

Martinez, C. B. R.; Nagae, M. Y.; Zaia, C. T. B. V.; Zaia, D. A. M. Acute morphological and physiological effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. Braz. J. Biol. (64) 4, p- 797-807, 2004.

Mazzei, F.; Botre, F.; Botre, C. Acid phosphatase/glucose oxidase-based biosensors for the determination of pesticides. Anal. Chim. Acta, 336: 67-75, 1996.

Maycock, D.S.; Prenner, M.M.; Kheir, R.; Morris, S.; Callaghan, A.; Whitehouse, P.; Morritt, D.; Crane, M. Incorporation of *in situ* and biomarker assays in higher-tier assessment of the aquatic toxicity of insecticides. Water Res. 37: 4180-90, 2003.

Mccord, J.M., Fridovich, I. Superoxide dismutase: the first twenty years (1968-1988). Free Radic Biol Med. v. 5, n. 5-6, p.363-369, 1988.

Molina, R.; Moreno, I.; Pichardo, S.; Jos, A.; Moyano, R.; Monterde, J. G.; Cameán, A. Acid and alkaline phosphatase activities and pathological changes induced in Tilápia fish (*Oreochromis sp.*) exposed subchronically to microcystins from toxic cyanobacterial blooms under laboratory conditions. Toxicon v. 46, p. 725-735, 2005.

Nebeker, A. V.; McKinney, P.; Cairns, M.A. Acute and chronic effects of Diflubenzuron (dimilin) on freshwater fish and invertebrates. Environ. Toxicol. Chem., v.2, p.239, 1983.

Nelson, D. L.; Cox, M. M. Lehninger Principles of Biochemistry, 4ª edição, W. H. Freeman, 2005.

OECD. Guidelines for Testing of Chemicals. Organization for Economic Cooperation and Development , Paris. 1981.

OECD. Guidelines for Testing of Chemicals. *Daphnia sp.*, Acute Immobilization Test and Reproduction Test, 202. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, 1984.

OECD. Guidelines for Testing of Chemicals. Fish, Acute Toxicity Test, 203. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, 1992.

OECD. Guidelines for Testing of Chemicals., Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test, 201. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, 1984 and 2006.

Oliveira-Ribeiro, C.A.; Guimarães, J.R.D.; Pfeiffer, W.C. Accumulation and distribution of inorganic mercury in a tropical fish (*Trichomycterus zonatus*). Ecotoxicol. Environm. Safety, 34, 190-195, 1996.

Ostrensky, A.; Borghetti, J.R.; Pedini, M. Situação atual da Aquicultura brasileira e Mundial. In: Valentil, C.V.; Poli, C,R.; Pereira, J.A.; Borghetti, J.B. Aquicultura no Brasil bases para um Desenvolvimento Sustentável. Brasília: CNPQ /Ministério da Ciência e Tecnologia, 354 – 381, 2008.

Otitoloju, A.; Olagoke, O. Lipid peroxidation and antioxidant defense enzymes in *Clarias gariepinus* as useful biomarkers for monitoring exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons pp 1-9 Environ Monit, 2011.

Ozcan, O. E.; Sevgiler, Y.; Uner, N. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. Comp. Biochem. Physiol. C, 137, 43–51, 2004.

Pandey, S.; Parvez, S.; Sayeed, I.; Haque, R.; Bin-Hafeez, B.; Raisuddin, S. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish Wallago attu (Bl. & Schn.). Sci Total Environm., 309, 105-115, 2003.

Park, K.S., Kahn, M.L. Distribution of two isoforms of NADP-dependent isocitrate dehydrogenase in soybean (*Glycine max*). *Plant Mol. Biol.* 40: 13-21, 1999.

Pereira, M.; L., Martinez, C.B.R., Acute effects of diflubenzuron on the freshwater fish *Prochilodus lineatus*, *Comp. Biochem. Physiol. C* (2008), doi:10.1016/j.cbpc.2008.06.010

Pitkänen, S. E.; Robinson, B.H. Mitochondrial complex I deficiency leads to increased production of superoxide radicals and induction of superoxide dismutase. *J. Clin. Invest.* V. 98, n. 2, p. 345-351, 1996.

Queiroz, J. F.; Silveira, M. P. Recomendações práticas para melhorar a qualidade da água e dos efluentes dos viveiros de aquicultura. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna/SP, dezembro/2006, ISSN 1516-4683 págs. 1-14 Circular Técnica nº 12, 2006.

Rahman, M.F.; Mahboob, M.; Gover, P. *In vitro* acetylcholinesterase inhibition by novel OP compounds in various tissues of the fish *Channa punctatus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 72: 38-44, 2004.

Rand, G.M. Fish toxicity studies. In: Giulio, R.T.D.; Hinton, D.E. *The Toxicology of Fishes*. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, London, New York, p.659-682, 2008.

Randhawa, V.K.; Zhou, F.; Jin, X.; Nalewajko, C.; Kushner, D.J. Role of oxidative stress and thiol antioxidant enzymes in nickel toxicity and resistance in strains of the green algae *Scenedesmus acutus* f. *alternans*. *Can. J. Microbiol.* 47: 987-993, 2001.

Ranzani-Paiva, M.J.T.; Rodrigues, E.L.; Eiras, A.C.; Veiga, M.L.; Pacheco, F.J. Alterações hematológicas em curimatá, *Prochilodus scrofa* STEINDACHNER, 1881, exposto ao Dipterex 500 (trichlorfon). *Bol. Inst. Pesca*, São Paulo, 24, 187-196, 1997.

Reddy, M.S.; Rao, R. Methylparathion induced alterations in the acetylcholinesterase and phosphatases in a penaeid prawn *Metapenaeus monoceros*. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* 45:350-357, 1990.

Repetto, G.; Peso, A. D.; Repetto, M. Alternative ecotoxicological methods for the evaluation, control and monitoring of environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Restoration* 31: 47-51, (2000).

Roberts, R.J. *Patologia de los peces*. Madrid: Edición Mundi-Prensa, p.366, 1981.

Rocha, O.; Güntzel, A. Filo Arthropoda. Classe Branchiopoda. In: Ismael, D.; Valenti, W.C.; Matsumura-Tundisi, T.; Rocha, O. (Ed.) 1999. *Invertebrados de Água Doce*. São Paulo, FAPESP. 176p. (vol. 4 da coleção "Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX", organizada por Joly, C.A. & Bicudo, C.E.M). Disponível em: <http://www.biota.org.br/pdf/v4cap17.pdf>. Acesso em 20 set 2012.

Round, F.E. *Biologia das algas*. 2a edição, Editora Guanabara Dois S.A , Rio de Janeiro. p. 263, 1973.

Saeed, A.; Tremori, E.; Manao, G.; Camici, G.; Cappugi, G.; Ramponi, G. Bovine brain low Mr acid phosphatase: purification and properties. *Physiol. Chem. Phys. & Med.* 22: 81-94, 1990.

Sancho, E., Fernández-Veja, C., Villarroel, M.J., Andreu-Moliner, E., Ferrando, M.D. Physiological effects of tricyclazole on zebrafish (*Danio rerio*) and post-exposure recovery. *Comp. Biochem. Physiol. C.*, n. 150, p. 25-32, 2009.

Schalch, S .H. C.; Belo, M. A. A.; Soares, V.E.; Moraes, J.R.E.; Moraes, F.R. Eficácia do diflubenzuron no controle de *Dolops carvalhoi* (Crustácea: *Branchiura*) em jovens pacus *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: *Characidae*) naturalmente infectados. *Acta. Sci. Anim. Sci.* 27, .297-302, 2005.

Schmidt, C. Schadwirkung Von Phenolen, Anilinen und Aliphaten auf Algen. In: *Chemikaliengesetz Heft 8, Prüfung und Bewertung von Stoffen auf ihre Umweltverträglichkeit*. Berlin, Umweltbundesamt, p. 98-137, 1989.

Shizhong, T.; Zan, L.; Jianhua, W.; Yongyuan, Z.; *Chemosphere*. 35, 2713, 1997.

Sommer, J.R.; Blum, J.J. Cytochemical localization of acid phosphatase in *Euglena gracilis*. *J. Cell. Biol.* 24: 235-251, 1965.

Stegeman, J.J.; Brouwer, M.; Di Guilio, R.T.; Forlin, L.; Fowler, B.A.; Sanders, B.M.; Van Veld, P.A. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effects. In: Huggett, R.J.; Kimerle, R.A.; Mehrle, J. and Bergman, H.L. Eds. Biomarkers: biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress., Lewis Publishers, Colorado, 235p., 1992.

Strmac, M.; Braunbeck, T. Isolated hepatocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as a tool to discriminate between differently contaminated small river systems. *Toxicol. In Vitro* 14: 361-377, 2000.

Suresh, P. G.; Reju, M. K.; Mohandas, A.; *Sci. Total Environ. Suppl.* 2, 1265, 1993.

Tanner, D. K; Moffet, M. F. Effects of diflubenzuron on the reproductive success of bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*. *Environm. Toxicol. Chem.* .14, 1345-1355. 1995.

Tornqvist, L. Ultrastructural changes and altered localization of acid phosphatases in Monoraphidium and Stichococcus cells (*Chlorophyceae*) influenced by aluminium. *Environ. Exp. Bot.* 29: 457-465, 1989.

Truhaut, R. Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. *Ecotoxicol. Environm. Saf.*, 1, 151-173, 1977.

Tsekos, I.; Schnepf, E. Acid phosphatase activity during spore differentiation of the red algae *Gigartina teedii* and *Chondria tenuissima*. *Pl. Syst. Evol.* 176: 35-51, 1991.

Ukeda, H.; Maeda, S.; Ishii, T.; Sawamura, M. Spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on tetrazolium salt 3'-{1-[(phenylamino)-carbonyl]-3,4-tetrazolium}-bis(4-methoxy-6-nitro) benzenesulfonic acid hydrate reduction by xanthine-xanthine oxidase. *Anal. Biochem.*, 251, 206-209, 1997.

USEPA (United States Environmental Protection Agency). 96-hour static toxicity test using *Selenastrum capricornutum*. Environmental Protection Agency SOP#: 2027. p.5, 1994.

USEPA (United States Environmental Protection Agency). Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms, EPA 600/7-91-002, Washington, DC, 1994.

USEPA. (United States Environmental Protection Agency). Prevention Pesticides and Toxic Substances. 1997. Disponível em:<http://www.epa.gov/oppsrrd1/reds/factsheets/0144fact.pdf>. Acesso em: 08 Mar. 2011.

Vainshtein, B.K., Melik-Adamyan, W.R., Barynin, V.V., Vagin, A.A., Grebenko, A.I. Three-dimensional structure of the enzyme catalase. *Nature*. v. 293, n. 5831, p. 411-412, Out 1981.

Van-Dyk, J.C. Fish histopathology as a monitoring tool for aquatic health: a preliminary investigation. Tese de Doutorado - University of Johannesburg, Johannesburg, South Africa, 2005.

Van Der Oost, R.; Beyer, J.; Vermeulen, N. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, Amsterdam, v.13, p. 57-149, 2003.

Venturini, F. P. Toxicidade aguda e respostas metabólicas e hematológicas do pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) exposto a concentração sub-letal de Triclorfon e recuperação. Tese de mestrado em Genética e Evolução. Universidade Federal de São Carlos, 2010.

Villarroel, M. J.; Sancho, E.; Ferrando, M.D.; Andreu, E. Acute, chronic and sublethal effects of the herbicides propanil on *Daphnia magna*. *Chemosphere*, .53,.857-864, 2003.

Wendt-Rasch L.; Van den Brink P.J.; Crum S.J.H.; Woin P. The effects of pesticide mixture on aquatic ecosystems differ in trophic status: responses of the macrophyte *Myriophyllum spicatum* and the periphytic community. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* v.57, p.383-398, 2004.

World Health Organization. Concise International Chemical Assessment Document 48, 4-chloroaniline, 2003.

Wynne, D.; Gophen, M. Phosphatase activity in freshwater zooplankton. *Oikos* 37: 369-376, 1981.

Youngs, H.L.; Sundaramoorthy, M.; Gold, M.H. Effects of cadmium on manganese peroxidase. Competitive inhibition of MnII oxidation and thermal stabilization of the enzyme. *Eur. J. Biochem.* 27: 1761-1769, 2000.

Yu, Miao; Wang, San-Hu; Luo, Yan-Rui; Han, Ya-Wei; Li, Xiao-Yu; Zhang, Bang-Jun; Wang, Jian-Ji. Effects of the 1-alkyl-3-methylimidazolium bromide ionic liquids on the antioxidant defense system of *Daphnia magna*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 72, 1798-1804, 2009.

Zagatto, P.A., Bertoletti, E. *Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações*. Editora Rima, São Carlos, 478p, 2006.

Zarr, J.H. *Biostatistical Analysis*. New Jersey: Prentice Hall, 3 ed., 1996.

Zhang, J.; Shen, H.; Wang, X.; Wu, J.; Xue, Y. Effects of chronic exposure of 2,4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish *Carassius auratus*. *Chemosphere*, 55, 167–174, 2004.

7- ANEXOS

7.1 Anexo 1. Protocolo do comitê de ética no uso animal.



CEUA/Unicamp

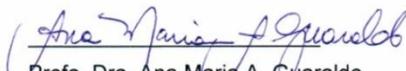
Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

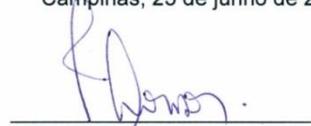
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "TOXICIDADE COMPARATIVA DO DIFLUBENZURON E p-CLOROANILINA EM FOSFATASES E ENZIMAS ANTIOXIDANTES DE ORGANISMOS NÃO-ALVOS" (protocolo nº 2756-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Hiroshi Aoyama / Darlene Denise Dantzger, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 25 de junho de 2012.

Campinas, 25 de junho de 2012.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Atoño
Secretária Executiva

7.2 Anexo 2. Preparo do meio de cultura de algas *Pseudokirchneriella subcapitata* (OECD, 1984) para se utilizar como alimento para daphnias (*Daphnia similis*).

Foram preparadas as seguintes soluções-estoque, dissolvendo-se os reagentes em um volume correspondente de água destilada.

Reagentes	Concentração. (g.L ⁻¹)
1. MgSO ₄ .7H ₂ O	7,5
2. NaNO ₃	50
3. NH ₄ NO ₃	33
4. K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	5,2
5. CaCl ₂ .2H ₂ O	3,5
6. Na ₂ CO ₃ .10H ₂ O	5,4
7. Citrato férrico	0,6
8. Ácido cítrico monohidratado	0,6
9. Solução de elementos traço:	
H ₃ BO ₃	2,9
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,81
ZnCl ₂	0,11
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,08
(NH ₄) ₇ Mo ₂₄ O ₈₄ .4H ₂ O	0,018

Um volume final de meio de cultura foi preparado adicionando-se os volumes correspondentes de solução estoque a um volume definido de água destilada de 10 L, conforme quadro a seguir.

Volume final do meio de cultura	Volumes de soluções-estoque (mL)									Água Destilada (mL)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Soluções estoque										
10 Litros	100	100	100	100	100	100	100	100	10	9190

Acrescentou-se ao meio 100 mL de algas da repicagem e levou-se à estufa de germinação. O meio de cultura foi aerado com ajuda de uma bombinha de aquário através de uma pedra porosa. A solução foi mantida sob luminosidade por 10 dias e após esta data, foi colocada na geladeira até decantar. Após decantação, o líquido sobrenadante foi removido com uma mangueirinha na forma de um sifão. O líquido que ficou no fundo foi retirado do galão e centrifugado por 15 minutos a 7000 rpm. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado dos tubos e a alga que restou foi lavada com uma porção de água destilada.

7.3 Anexo 3. Repicagem das algas *Pseudokirchneriella subcapitata*

Foram preparadas as seguintes soluções-estoque, dissolvendo-se os reagentes em um volume correspondente de água destilada.

Reagentes	Concentração. (g.L ⁻¹)
1. MgSO ₄ .7H ₂ O	7,5
2. NaNO ₃	50
3. NH ₄ NO ₃	33
4. K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	5,2
5. CaCl ₂ .2H ₂ O	3,5
6. Na ₂ CO ₃ .10H ₂ O	5,4
7. Citrato férrico	0,6
8. Ácido cítrico monohidratado	0,6
9. Solução de elementos traço:	
H ₃ BO ₃	2,9
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,81
ZnCl ₂	0,11
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,08
(NH ₄) ₇ Mo ₂₄ O ₈₄ .4H ₂ O	0,018

Foi preparado 2L do meio de cultura em um erlenmeyer, adicionando 20 mL da solução de 1 até 8 e 2 mL da solução 9. Após esta solução foi separada em porções de 100 mL em erlenmeyers de 250 mL. Em seguida estes foram autoclavados durante 20 minutos. Em cada erlenmeyer foi adicionado 10 mL da cultura velha de microalgas em ambiente esterilizado. Os erlenmeyers foram colocados sob luz e agitação contínua para o crescimento algáceo.

8- APÊNDICES

8.1 Apêndice 1. Parâmetros físico-químicos da água de cultivo de daphnias antes e após o teste de toxicidade aguda com os compostos DFB e PCA.

Poluente	Leituras*	pH	OD (mg/mL)	Dureza (mg/mL)	Condutividade (μ S/cm)
Controle**	-	7,6 – 7,5	8 - 6	50	160 - 165
DFB	1	7,4 – 7,1	8 – 6	50	157 - 158
	2	7,2 – 7,62	8 – 6	50	155 - 163
PCA	1	7,43 – 7,26	8 – 6	50	166 - 161
	2	7,55 – 7,25	8 – 6	50	166 - 162

* As leituras 1 referem-se à água de cultivo da menor concentração do poluente testado que não causa efeito deletério nos organismos e as leituras 2 correspondem à água de diluição da maior concentração do poluente testado, conforme ABNT (2004).

** Os valores apresentados para o grupo Controle referem-se à média obtida durante a execução dos testes.

8.2 Apêndice 2. Ensaio de toxicidade aguda com dicromato de potássio para daphnia similis

Meses	EC50 (mg/L)	Níveis de Significância (95%)	pH	OD (mg/L)	Dureza (mg/L)	Condutividade (μ S/cm)
07/2011	0,107	0,057 - 0,232	7,4 - 7,6	8 - 6	50 - 50	155 - 158
08/2011	0,122	0,015 - 0,148	7,5 - 7,48	8 - 6	50 - 50	154 - 157
09/2011	0,04	0,031 - 0,065	7,4 - 7,5	8 - 4	50 - 50	157 - 157
10/2011	0,02	0,021 - 0,031	7,55 - 7,56	8 - 6	50 - 50	160 - 165
11/2011	0,09	0,047 - 0,195	7,53 - 7,6	8 - 6	50 - 50	165 - 167
Média	0,09	-	-	-	-	-

*O EC50 e seus respectivos valores de 95% de significância foram calculados no programa EPA PROBIT ANALYSIS PROGRAM (versão 1.5).

8.3 Apêndice 3. Parâmetros físico-químicos da água de cultivo de peixes antes e após o teste de toxicidade aguda com os compostos DFB e PCA.

Poluente	Leituras*	pH	OD (mg/mL)	Dureza (mg/mL)	Condutividade (μ S/cm)
Controle**	-	7,1 – 7,4	8 - 6	50	158 - 163
DFB	1	7,8 – 7,7	8 – 6	50	160 - 168
	2	7,6 – 7,62	8 – 6	50	149 - 163
PCA	1	7,53 – 7,86	8 – 6	50	166 - 161
	2	7,45 – 7,95	8 – 6	50	167 - 168

* As leituras 1 referem-se à água de cultivo da menor concentração do poluente testado que não causa efeito deletério nos organismos e as leituras 2 correspondem à água de diluição da maior concentração do poluente testado, conforme ABNT (2004).

** Os valores apresentados para o grupo Controle referem-se à média obtida durante a execução dos testes.

8.4 Apêndice 4. Parâmetros físico-químicos da água de cultivo de daphnias antes e após o teste bioquímico com os compostos DFB e PCA.

Poluente	Leituras*	pH	OD (mg/mL)	Dureza (mg/mL)	Condutividade (μ S/cm)
Controle**	-	7,7 – 7,6	8 - 6	50	165 - 165
DFB	1	7,5 – 7,6	8 – 6	50	167 - 168
	2	7,1 – 7,3	8 – 6	50	165 - 163
PCA	1	7,3 – 7,2	8 – 6	50	166 - 165
	2	7,4 – 7,35	8 – 6	50	165 - 162

* As leituras 1 referem-se à água de cultivo da menor concentração do poluente testado que não causa efeito deletério nos organismos e as leituras 2 correspondem à água de diluição da maior concentração do poluente testado, conforme ABNT (2004).

** Os valores apresentados para o grupo Controle referem-se à média obtida durante a execução dos testes.

8.5 Apêndice 5. Parâmetros físico-químicos da água de cultivo de peixes antes e após o teste bioquímico com os compostos DFB e PCA.

Poluente	Leituras*	pH	OD (mg/mL)	Dureza (mg/mL)	Condutividade (μ S/cm)	Temperatura °C
Controle**	-	7,7 – 7,6	8 - 6	50	165 - 165	27,8-28
DFB	2	7,5 – 7,6	8 – 6	50	167 - 168	27,9-28,1
PCA	1	7,3 – 7,2	8 – 6	50	166 - 165	28-28,1
	2	7,4 – 7,35	8 – 6	50	165 - 162	27,9-27,8

* As leituras 1 referem-se à água de cultivo da menor concentração do poluente testado que não causa efeito deletério nos organismos e as leituras 2 correspondem à água de diluição da maior concentração do poluente testado, conforme ABNT (2004).

** Os valores apresentados para o grupo Controle referem-se à média obtida durante a execução dos testes.

8.6 Apêndice 6. Atividade das enzimas FAT, Falc, CAT e SOD dos organismos sob o efeito de diferentes concentrações de DFB e PCA *in vitro*.

O controle foi considerado como 100% e as concentrações foram testadas de acordo com a descrição em Métodos. Os resultados estão expressos como média±DP de, no mínimo, três experimentos realizados em triplicata. *diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) em relação ao controle.

