



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

KALINE CATIELY CAMPOS SILVA

Biomonitoramento de pesticidas e metais pesados em projetos de Irrigação no Rio São Francisco utilizando marcadores bioquímicos e genotóxicos de *Cichla ocellaris*

Recife - PE

2016

KALINE CATIELY CAMPOS SILVA

Biomonitoramento de pesticidas e metais pesados em projetos de Irrigação no Rio São Francisco utilizando marcadores bioquímicos e genotóxicos de *Cichla ocellaris*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biologia para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pernambuco

Área de concentração:

Orientador: Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra

Co-Orientador: Dr. Caio Rodrigo Dias de Assis

Recife - PE

2016

Catálogo na fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia - CRB-4/1788

Silva, Kaline Catiely Campos

Biomonitoramento de pesticidas e metais pesados em projetos de irrigação no Rio São Francisco utilizando marcadores bioquímicos e genotóxicos de *Cichla ocellaris* / Kaline Catiely Campos. Silva – 2018.

131 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra.

Coorientador: Dr. Caio Rodrigo Dias de Assis

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2018.

Inclui referências.

1. Água – poluição. 2. Ecologia lacustre. 3. Saúde ambiental. I. Bezerra, Ranilson de Souza (Orientador). II. Assis, Caio Rodrigo Dias de (Coorientador). III. Título.

577

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2018 – 442

KALINE CATIELY CAMPOS SILVA

**BIOMONITORAMENTO DE PESTICIDAS E METAIS PESADOS EM PROJETOS
DE IRRIGAÇÃO NO RIO SÃO FRANCISCO UTILIZANDO MARCADORES
BIOQUÍMICOS E GENOTÓXICOS DE *CICHLA OCELLARIS*.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biologia para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pernambuco

APROVADA EM 31/10/2016

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Ian Porto Gurgel do Amaral (Examinador Externo)
Universidade Federal da Paraíba

Profa. Dra. Marina Marcuschi (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Mônica Lúcia Adam (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

**À minha princesa Laura, pela
sabedoria e fortaleza de aturar cada minuto
que passamos distantes.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço infinitamente a Deus! Não deve ser fácil cuidar de mim, mais muito obrigada Senhor por me proteger sempre e provar a Tua maravilhosa presença em minha vida! É graças a Ti essa conquista.

Ao meu amor Mecier Soares que, em todos os momentos, com paciência, confiança e muito amor, me ensinou com exemplo, a importância de sermos um! Pela infinita paciência, atenção, compreensão e apoio em todas as minhas decisões, sem importar a distância! Pelo seu esforço e dedicação em me fazer feliz e incentivo para me fazer vencer! Obrigada por cuidar de nossa filha, ser pai e muitas vezes, mãe, quando estive ausente!

Aos meus pais, Pedro e Dalvina pela confiança, noites em claro e orações que me dedicaram.

As minhas irmãs, Keyla e Kilma e sobrinhos, Emilly, Douglas, Nicolly, Murilinho e Nycolas pela alegria, carinho e fé nas minhas lutas.

Ao meu orientador, Ranilson de Souza Bezerra, pela porta que me abriu, pela simpatia, tolerância e confiança de que eu poderia conseguir!

A Profa. Dra. Mônica Adam, por seus valiosos ensinamentos e pela sua doçura constante.

Ao meu co-orientador Caio Rodrigo Dias de Assis.

A meu amigo Mazinho, pela colaboração e esforço em pescar comigo e conseguir meus peixes!!

As minhas grandes amigas Kelma e Marly, minhas fortalezas!

A minha cunha Diana, por dividir comigo tantos momentos.

A minhas amigas de apartamento, Deja, Taci e Ana Maria.

A todos que fazem o LABENZ.

Agradecimentos a FACEPE, pelo apoio financeiro!

RESUMO

A presente tese teve como objetivo realizar o biomonitoramento do Lago de Itaparica-PE, durante as estações seca e chuvosa do ano de 2015 e 2016, nas proximidades de projetos de Irrigação: Barreiras (B), Apolônio Sales (AS) e Icó Mandantes (IM); utilizando o tucunaré (*Cichla ocellaris*) como biomonitor. Esta espécie também foi coletada em uma região de referência. Para o monitoramento bioquímico foi caracterizada físico-química e cineticamente a enzima acetilcolinesterase cerebral do tucunaré, bem como avaliado o efeito de pesticidas organofosforados e carbamatos, e íons sobre sua atividade com a fim de fornecer subsídios para o uso da referida enzima como ferramenta bioindicadora de contaminação ambiental. Biomarcadores enzimáticos (AChE, BChE, CAT, SOD) e não enzimáticos, GSSG, GSH e Peroxidação Lipídica (PL) foram dosados no cérebro e no fígado. Foi feito ensaio de Genotoxicidade e mutagenicidade através do Ensaio Cometa (EC) e Micronúcleo (MN) em eritrócitos de tucunaré. Também foram analisados parâmetros físico-químicos da água de todos os pontos de coleta. Na caracterização enzimática os resultados demonstraram que o pesticida diclorvós provocou forte inibição na atividade da enzima estudada. O organofosforado TEPP também a inibiu fortemente e os dois carbamatos utilizados, sobretudo o carbofuran, apresentaram valores baixos de CI50. Os íons que causaram maior inibição foram Cu^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} , As^{3+} e Pb^{2+} , enquanto que o íon complexo EDTA^{2-} só inibiu a enzima estudada a partir de 10 mM. O impacto genotóxico foi confirmado pela detecção de microlesões no DNA por meio do ensaio cometa, e pela alta frequência de macrolesões (MN). Em 2015, no período chuvoso, o ensaio cometa apresentou diferenças significativas entre os locais de coleta. O maior índice de dano ocorreu no B ($229,88 \pm 87,62$) diferindo do AS ($p=0,0001$) e do IM ($p=0,01$). No ano de 2016, no período chuvoso, o índice de dano entre o controle e os demais pontos amostrados foi bastante significativo. A diferença entre os pontos foi significativa apenas entre o IM e os demais. Os danos no DNA foram mais frequentes em 2016 com maior significância para o IM e B. No período seco deste mesmo ano, o IM apresentou-se com danos mais frequentes que os demais pontos analisados ($p<0,0001$). O teste do MN não mostrou diferença quando comparado dentro da mesma estação durante os dois anos de estudo, mas a diferença foi significativa entre os pontos amostrados. No presente estudo foi observado diferenças sazonais significativas ($p<0,05$) e respostas antagônicas para AChE e BChE, e para SOD e CAT nos projetos AS e IM durante as estações. Estes resultados corroboram com o nível de PL para os mesmos pontos. Analisados

em conjunto, os dados obtidos apontam a espécie em estudo como um bom biomonitor e indicam que esses organismos apresentaram indícios de neurotoxicidade, genotoxicidade ou de danos causados por estresse oxidativo a macromoléculas. Eles também apontam para a importância de considerar não apenas a sazonalidade, mas a dinâmica ecológica de cada projeto de irrigação que influenciaram fortemente nas respostas dos biomarcadores estudados.

Palavras-chave: Biomarcadores. *Cichla ocellaris*. Lago de Itaparica. Contaminação ambiental.

ABSTRACT

The objective of this thesis was to perform biomonitoring of Lake Itaparica-PE, during the dry and rainy seasons of 2015 and 2016, in the vicinity of three Irrigation projects: Barreiras (B), Apolônio Sales (AS) and Icó Mandantes (IM); using the tucunaré (*Cichla ocellaris*) as biomonitor. This species was also collected in a reference region (CODEVASF Headquarters) in Penedo, AL. For the biochemical monitoring the physicochemical and kinetic characterization of the cerebral acetylcholinesterase enzyme of the tucunaré was evaluated, as well as the effect of organophosphorous pesticides and carbamates, and ions on its activity with the purpose of providing subsidies for the use of said enzyme as a bioindicator tool of contamination. Enzymatic (AChE, BChE, CAT, SOD) and non-enzymatic biomarkers, GSSG, GSH and Lipid Peroxidation (PL) were measured in the brain and liver. Genotoxicity and mutagenicity tests were carried out using the Cometa Assay (EC) and Micronucleus (MN) assays on Tucunaré erythrocytes. Physical-chemical parameters of the water from all collection points were also analyzed. In the enzymatic characterization the results demonstrated that the pesticide dichlorvos caused strong inhibition in the activity of the studied enzyme. The organophosphate tetraethyl pyrophosphate (TEPP) also strongly inhibited it and the two carbamates used, especially carbofuran, showed low IC₅₀ values. The ions that caused the highest inhibition were Cu²⁺, Zn²⁺, Hg²⁺, Cd²⁺, As³⁺ and Pb²⁺, whereas the complex ion EDTA²⁻ only inhibited the enzyme studied from 10 mM. In this way, the *in vitro* inhibition of tucunaré acetylcholinesterase is a promising tool for the environmental monitoring of water resources. The genotoxic impact was confirmed by the detection of microlesions in the DNA by the comet assay, and by the high frequency of macrolesions (MN). In the year 2015, in the rainy season, the comet test showed significant differences among the collection sites. The highest damage index occurred in B (229.88 ± 87.62), differing from AS ($p = 0.0001$) and MI ($p = 0.01$). In the year of 2016, in the rainy season, the damage index between the control and the other points sampled was quite significant ($p < 0.0001$). The difference between the points was significant only between the MI and the others. DNA damage was more frequent in 2016 with greater significance for MI and B. In the dry period of the same year, MI presented with more frequent damages than the other points analyzed ($p < 0.0001$). IM was the point that presented the highest damage index during the years studied, as the highest damage index in 2016 ($p = 0.0001$). The MN test showed no difference when compared within the same station during the two years of study,

but the difference was significant between the points sampled. During the rainy season of 2015 AS and B ($p = 0.004$) and in the dry period of the same year the MI was significantly different from the others ($p = 0.026$). In the present study we observed significant seasonal differences ($p < 0.05$) and antagonistic responses for AChE and BChE, and for SOD and CAT in the AS and IM projects during the seasons. These results corroborate with the PL level for the same points. Together, the obtained data point to the study species as a good biomonitor and indicate that these organisms showed signs of neurotoxicity, genotoxicity or damage caused by oxidative stress to macromolecules. They also point out the importance of considering not only the seasonality but the ecological dynamics of each irrigation project that strongly influenced the responses of the biomarkers studied here.

Key-words: Biomarkers. *Cichla ocellaris*. Lake of Itaparica. Environmental contamination.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AChE	Acetilcolinesterase
ACh	Acetilcolina
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância sanitária
BChE	Butirilcolinesterase
CAT	Catalase
CBs	Carbamatos
ChEs	Colinesterases
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTNB	Ácido 5,5' Ditiobis (2-nitrobenzóico)
EC	Ensaio Cometa
EDTA	Etileno-diamina-tetra-acético
ES	Complexo Enzima-Substrato
FAO	Organização das nações Unidas para Alimentação e Agricultura
IC ₂₀	Concentração que inibi 20% da atividade enzimática
IC ₅₀	Concentração que inibi 50% da atividade enzimática
Iso-OMPA	Tetraisopropil pirofosforamida
IUBMB	União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
k	Constante de velocidade
KDa	Quilo Daltons
K _i	Constante de inibição
K _m	Constante de Michaelis-Menten
Mm	Milimolar
MN	Micronúcleo
MPA	Ministério da Pesca e Aquicultura
MS	Ministério da Saúde
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPs	Organofosforados
PGs	Pepsinogênios

POPs	Poluentes orgânicos persistentes
ROS	Reactive Oxygen Species
SOD	Superóxido dismutase
Tris	Tris-hidróximetil-aminometano
U/mg	Unidades de atividade enzimática por miligrama
USEPA	National Primary Drinking Water Standards
V _{max}	Velocidade máxima de catálise atingida por uma enzima
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 OBJETIVOS	16
1.1.1 Geral	16
1.1.2 Específicos	16
2 REVISÃO	18
2.1 A AREA DE ESTUDO	18
2.1.1 Projeto Apolônio Salles.....	19
2.1.2 Projeto Barreiras	19
2.1.3 Projeto Icó-Mandantes.....	20
2.2 RECURSOS HÍDRICOS E MONITORAMENTO AMBIENTAL	22
2.3 BIOMONITORES	23
2.4 A ESPÉCIE EM ESTUDO	24
2.5 BIOMARCADORES.....	25
2.6 BIOMARCADORES NEUROTÓXICOS	26
2.6.1 Colinesterase	26
2.7 BIOMARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO	27
2.7.1 Lipoperoxidação (LPO)	29
2.7.2 Catalase	30
2.7.3 SOD	30
2.8 BIOMARCADORES GENÉTICOS	31
2.8.1 Micronúcleo	31
2.8.2 Ensaio Cometa	33
3 RESULTADOS	34
3.1 EFEITOS DA AGRICULTURA E AQUICULTURA INTENSIVA EM UM RESERVATÓRIO DO RIO SÃO FRANCISCO UTILIZANDO PARÂMETROS DE DANOS GENÔMICOS EM CICHLA OCELLAIS	34
3.2 MARCADORES BIOQUÍMICOS DE CICHLA OCELLARIS NO MONITORAMENTO AMBIENTAL	55
4 CONCLUSÃO.....	83

REFERÊNCIAS	84
APÊNDICE A- ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA AQUACTIC TOXICOLOGY.	92

1 INTRODUÇÃO

Os recursos naturais, como se não fossem um bem finito ou fundamental para a existência de todos os seres vivos, vêm sendo cada vez mais degradados pelas práticas humanas, mesmo nos dias atuais, diante de um cenário em que a água tem se tornado uma das maiores preocupações para as populações que estão sendo afetadas pela sua contaminação ou escassez, em todo país. Os ecossistemas aquáticos são definidos como sumidouros, uma vez que os mesmos recebem as mais diversas substâncias provenientes da drenagem e lixiviação do ambiente terrestre. Além disso, atividades antropogênicas como a industrialização, construções de reservatórios, atividades agrícolas e a ocupação humana no entorno destes corpos d'água, têm alterado os ecossistemas e contribuído para a desestruturação da dinâmica das comunidades biológicas (GOULART; CALLISTO, 2003).

A poluição é um problema compartilhado por cidades, países e continentes. Alguns poluentes, carregados pela atmosfera e pela água, por exemplo, se propagam por grandes distâncias. Os pesticidas incluem-se dentre eles (DUBUS et al., 2000; BARR et al., 2004).

O Brasil é um dos maiores consumidores de pesticidas do mundo (CALDAS, 2000). A utilização de pesticidas cresceu com a exploração agrícola intensiva, pois melhora a produção animal e vegetal porque elimina parasitas que competem por alimentos ou causam doenças. Entretanto, estas substâncias trazem riscos ao meio ambiente e à saúde humana e animal, pois podem causar intoxicação aguda além de possíveis efeitos crônicos, difíceis de serem relacionados à exposição em baixas concentrações (COOPER et al., 1999).

Organofosforados e carbamatos fazem parte do cotidiano do campo e das cidades. São as classes de inseticidas mais importantes no mundo. Em 2007, somente os organofosforados responderam por 35% de todos os inseticidas utilizados nos EUA (USEPA, 2011). Esses pesticidas são inibidores típicos das enzimas colinesterases (WHO, 1986a; 1986b; QUINN, 1987; FUKUTO, 1990; JARRARD et al., 2004). O mecanismo principal de ação desses compostos se dá através da ligação com o sítio esterásico das colinesterases com fosforilação para organofosforados e carbamilação no caso dos carbamatos, produzindo a inibição da enzima (QUINN, 1987).

As colinesterases são enzimas da família das serino-esterases, presentes no sistema nervoso, tecidos musculares, hepáticos e sistema circulatório de vertebrados e invertebrados. A acetilcolinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) tem como principal e clássica função a regulação da transmissão dos impulsos nervosos entre os neurônios desativação do neurotransmissor acetilcolina, garantindo a intermitência dos impulsos nervosos responsáveis pela comunicação

neuronal. Já a butirilcolinesterase (BChE, EC 3.1.1.8), de função não totalmente elucidada é apontada principalmente como uma enzima detoxificadora e eventual substituta da AChE (QUINN, 1987; MESULAM et al., 2002; ÇOKUGRAS, 2003; SILMAN e SUSSMAN, 2005). Mas os efeitos primários dos organofosforados e carbamatos não se restringem às colinesterases: cerca de 50 esterases podem ser inibidas, dentre elas algumas enzimas digestivas como a tripsina (EC 3.4.21.4), quimotripsina (EC 3.4.21.1) e carboxipeptidase (EC 3.4.17.15) (KAM et al., 1979; FISCHER, 1988; CASIDA e QUISTAD, 2004 e 2005).

Além disso, existe uma cadeia de efeitos secundários decorrentes da exposição aos pesticidas em questão. Organofosforados e carbamatos são capazes de, indiretamente, induzir a formação excessiva de radicais livres, causadores de estresse oxidativo (BAGCHI et al., 1995; HAI et al., 1997; FERRARI et al., 2007). O grau de tal estresse pode ser observado através do balanço entre a formação desses radicais e as defesas antioxidantes produzidas pelos organismos (SUREDA et al., 2006). Foi observado que parte da resistência ao estresse oxidativo, causado por pesticidas, é influenciada pelo complexo antioxidante do qual fazem parte as enzimas catalase (CAT, EC 1.11.1.6) e superóxido-dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) (BAGCHI et al., 1995; HAI et al., 1997; BASHA e RANI, 2003). A observação das alterações na atividade das enzimas detoxificantes aponta para outras vias de monitoramento através do estresse oxidativo gerado (BAGCHI et al., 1995; HAI et al., 1997; SUREDA et al., 2006), além de serem parâmetros de validação para os resultados obtidos com as colinesterase. Através dos efeitos primários e secundários causados por esses praguicidas, tanto nas enzimas inibidas como nas detoxificadoras, é possível detectar e quantificar níveis de poluentes presentes em um meio (STURM et al., 1999; RODRÍGUEZ-FUENTES e GOLD-BOUCHOT, 2000; SCOTT e SLOMAN, 2004).

Pesticidas e outros poluentes industriais como metais pesados podem induzir a alterações genotóxicas, clastogênicas direta ou indiretamente (através do estresse oxidativo) formando adutos de DNA, modificando o perfil proteômico de um organismo exposto (AL-SABTI e METCALF, 1995; BAGCHI et al., 1995; MARNETT, 1999; CASIDA e QUISTAD, 2004; ÇAVAŞ e KÖNEN, 2007).

Diversas ferramentas de monitoramento ambiental vêm sendo avaliadas quanto à eficácia, praticidade e viabilidade econômica. Dentre elas, destacam-se as metodologias que utilizam moléculas provenientes de seres vivos como indicadores e/ou antagonistas de substâncias nocivas, tendo em vista sua alta especificidade em relação a esses compostos (MARCO e BARCELÓ, 1996; ARIAS et al., 2007). Tais metodologias utilizam diversas

técnicas, seja pela estimação da densidade populacional e alterações comportamentais, seja por uma característica fisiológica desses organismos que os torna sensíveis a determinados poluentes. A escolha desses organismos se dá através de características como habitat, ecologia, hábitos alimentares, abundância da espécie e facilidade de captura. (STURM et al., 1999; FULTON e KEY, 2001; SCOTT e SLOMAN, 2004).

Sendo assim, o monitoramento ambiental usando organismos biológicos, principalmente os peixes, serve como uma alerta dos riscos não apenas para populações aquáticas, mais também para todos os demais animais, inclusive a espécie humana, que além de utilizar a água para os mais variados fins, ainda está no topo da cadeia alimentar podendo sofrer uma bioacumulação de agentes tóxicos que estão presentes na água, mesmo que em pequenas quantidade.

No presente estudo, a espécie escolhida como fonte de acetilcolinesterase foi o tucunaré (*Cichla ocellaris*), que segundo (FONTENELE, 1948; SILVA et al., 1980) é um peixe pertencente ao gênero *Cichla sp.* (Teleostei, Actinopterygii, Cichlidae), incluído entre as espécies nativas de grande importância para a pesca esportiva. Originário da bacia amazônica, o tucunaré é uma espécie de hábito alimentar carnívoro e tem demonstrado considerável eficiência no controle de peixes invasores em represas. Sua utilização prende-se não apenas à importância econômica e facilidade de aquisição, mas também por ser uma espécie sedentária e não migratória, característica capaz de evidenciar diferenças entre os locais de amostragem.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Geral

Esse trabalho tem como objetivo geral caracterizar físico-química e cineticamente a acetilcolinesterase do cérebro, da espécie *Cichla ocellaris*, investigar o efeito de íons e pesticidas organofosforados e carbamatos sobre sua atividade, bem como utilizar biomarcadores enzimáticos e de genotoxicidade, desta espécie, no monitoramento ambiental do reservatório da barragem de Itaparica, no município de Petrolândia, Pernambuco.

1.1.2. Específicos

- ✓ Determinar a atividade da acetilcolinesterase, butirilcolinesterase, catalase, superóxido dismutase, em tecidos de *Cichla ocellaris* coletados no reservatório da barragem de Itaparica;

- ✓ Determinar danos ao DNA dos espécimes coletados, em escala temporal e espacial, causados pelos poluentes presentes nos ambientes de coleta, através de testes de genotoxicidade (DNA cometa e teste do micronúcleo);
- ✓ Definir as propriedades físico-químicas, cinéticas e parâmetros de eficiência catalítica da acetilcolinesterase do tucunaré;
- ✓ Analisar o efeito de cinco pesticidas organofosforados e dois carbamatos sobre a atividade da enzima em questão;
- ✓ Analisar o efeito de íons sobre a atividade da enzima estuda

2 REVISÃO

2.1 A ÁREA DE ESTUDO

O Rio São Francisco foi um fator relevante na ocupação do território nordestino e isso até hoje torna o seu uso cada vez mais complexo evidenciando-se os conflitos gerados pelas intervenções institucionais e as reais necessidades das populações nas suas dependências.

Com a construção da usina hidrelétrica Luíz Gonzaga em 1987 e o desvio no cursor do rio, famílias ficaram desabrigadas e para seu reassentamento foram construídos os projetos de irrigação, nas margens do lago, com a finalidade de reestruturar a produtividade agrícola regional, que já era desenvolvida por produtores que tiveram suas terras inundadas devido a construção dessa hidrelétrica.

A origem e a concepção dos projetos de irrigação existentes em Petrolândia – PE foram marcadas por fatos bastante significativos, no que diz respeito às questões ambientais, que contribuíram e contribuem para a formação de um quadro de grande desequilíbrio nos ecossistemas da região. Essa é uma situação que se repete em todos os perímetros de irrigação existentes no País (CONDEPE-FIDEM, 2001).

Com o passar dos anos esta situação foi piorando por conta de novos desmatamentos realizados pela própria população, que de forma desordenada retirava madeira e/ou fabricava carvão, principalmente nas margens dos riachos e de seus afluentes, em busca de alternativas econômicas para o sustento familiar, uma vez que o atraso na entrega dos lotes irrigados por parte do Governo Federal provocou uma grande ociosidade da mão-de-obra potencialmente disponível nas agrovilas. A grande maioria das manchas de solo do Projeto, onde foram implantadas as áreas irrigadas, são de areia quartzosa, com índice extremamente baixo de matéria orgânica, contribuindo para o desequilíbrio nutricional das culturas, e, conseqüentemente, tornando-as alvo fácil das infestações, principalmente de pragas e doenças. Além disso, a matéria orgânica proveniente de fontes externas é escassa na região sendo, por isso, muito cara para ser adquirida pelas famílias reassentadas, e os solos arenosos não retêm a umidade favorecendo o carreamento dos fertilizantes químicos solúveis para o lençol freático com mais rapidez (CONDEPE-FIDEM, 2001).

Desde que o reservatório de Itaparica entrou em operação, em 1988, com a inundação de 805 km², tem-se verificado uma série de problemas ambientais, decorrentes do uso descontrolado das margens do lago por atividades agrícolas e ocupações urbanas (SobraL et al., 2006).

Como observado por Melo (2006), em várias partes do reservatório não está sendo respeitada a faixa de 100 m de área de preservação permanente prevista na resolução nº 04/85 do CONAMA, sendo observados desmatamentos para agricultura e construções irregulares no entorno do reservatório. Além disso, a utilização de agroquímicos em grande parte de seus perímetros irrigados, somada à falta de fiscalização adequada, possibilita o lançamento de efluentes sem tratamento diretamente no reservatório.

2.1.1 Projeto Apolônio Salles

O Projeto Apolônio Salles, situado nas proximidades da cidade de Petrolândia-PE, está distribuído em 04 setores e 21 quadras hidráulicas, e 101 lotes para uma área irrigável de 808 ha (8 ha por família) ocupada por 100 famílias, sendo um lote usado como Unidade de observação e demonstração. Este projeto tem uma produção de 3904,61 toneladas de gêneros agrícolas com destaque para a produção de coco e banana (Tabela 1) (CONDEPE/FIDEM (2001).

Tabela 1. Principais culturas, áreas cultivadas e produção, em toneladas do Projeto de Irrigação Apolônio Sales, em Petrolândia, em 2007

Principais Culturas	Área cultivada em (ha)	Produção em toneladas/mês
Banana	235,00	2496,00
Coco	267,10	330,00
Manga	57,00	560,00
Goiaba	43,50	28,60
Mandioca	18,60	85,00
Uva	17,35	256,50
Melancia	13,60	144,00
Milho	13,10	18,50
Feijão	11,00	4,51
Outras	4,1	4,51
Total	667,25	3904,61

Fonte: Relatório técnico da CODEVASF-DEZ/2007

2.1.2 Projeto Barreiras

Este projeto está localizado nos municípios pernambucanos de Petrolândia e Tacaratu e conta com 10 agrovilas e um total de 377 famílias. O total da área plantada é de 172,58

hectares com uma produção de 314,57 toneladas de gêneros agrícolas (Tabela 2) (RELATÓRIO TÉCNICO, CODEVASF, 2007).

O Projeto Barreiras possui dois Blocos – I e II – localizados em áreas bem distintas quanto a tipos e composição de solos e topografia, bem como em relação à localização e proximidade do lago. Em algumas pequenas faixas perpendiculares à borda d'água, têm cultivos de fruteiras já implantados; na lateral esquerda da estrada que dá acesso às agrovilas e ao Bloco II como um todo, existem várias jazidas de onde foi extraído barro para construção do Projeto e mais recentemente para revestir a nova estrada vicinal de acesso ao Projeto Icó-Mandantes, que passa por fora do Projeto Apolônio Sales; na divisa dos Blocos I e II, também existem jazidas das quais foram extraídos materiais para aterros. Existem 80 famílias distribuídas numa área total de 3.266 ha, sendo que cada lote possui 5 ha CONDEPE/FIDEM (2001).

Tabela 2. Principais culturas, áreas cultivadas e produção, em toneladas do Projeto de Irrigação Barreiras, em Petrolândia, em 2007

Principais Culturas	Área cultivada em (ha)	Produção em toneladas/mês
Coco	95,08	190,00
Banana	26,01	35,62
Goiaba	16,96	25,00
Feijão	9,8	3,45
Maracujá	8,27	22,36
Manga	5,94	12,30
Outras	10,52	25,84
Total	172,58	314,57

Fonte: Relatório técnico da CODEVASF-DEZ/2007

2.1.3 Projeto Icó-Mandantes

Localizado no município de Petrolândia-PE, o Projeto Icó-Mandantes possui 800 famílias distribuídas em 14.981 ha, sendo, em média, 3 ha para cada família. Nesse Projeto destacam-se as seguintes características: grande área degradada e em expansão na área em torno do Morro do Papagaio, onde se localiza o reservatório do Bloco 03, devido ao desmatamento

em área de encostas e à movimentação de solo com máquinas pesadas; muitos desmatamentos de áreas na borda do Lago, para cultivos irrigados, principalmente com uso de moto-bombas. Diversas jazidas de onde foram tirados grandes volumes de cascalho para a construção de estradas principais e secundárias e ruas das agrovilas, com desmatamento das bordas; intensificação da degradação de áreas com desmatamento antigo anterior à implantação do Projeto e sobre pastoreio, cuja tendência é ampliar-se com o passar do tempo; desmatamento acentuado de áreas laterais dos drenos coletores que escoam direto para o Lago de Itaparica. (CONDEPE/FIDEM, 2001).

Possui 136 hectares cultivados, com uma produção total de 1381,71 toneladas de produtos colhidos em dezembro de 2007. (CODEVASF, 2007)

Tabela 3. Principais culturas, áreas cultivadas e produção, em toneladas do Projeto de Irrigação Barreiras, em Petrolândia, em 2007

Principais Culturas	Área cultivada em (ha)	Produção em tonelada/mês
Coco	49,90	293,40
Melancia	22,37	444,40
Jerimum	20,63	344,40
Feijão	12,80	20,61
Manga	9,16	110,21
Abobora	11,24	142,85
Outras	10,52	25,84
Total	136,62	1381,71

Fonte: Relatório técnico da CODEVASF-DEZ/2007

A agricultura irrigada dentro do perímetro irrigado de Icó-Mandantes foi implementada em etapas, a partir do início de operação das Estações de Bombeamentos (EB). – Ano de 1993, EB-02 e EB-03 com atual capacidade de bombeamento de 949m³/h; – Ano de 1995, EB-04 e EB-05 com atual capacidade de bombeamento de 1.419m³/h; – Ano de 1998, EB-01 com atual capacidade de bombeamento de 1.827m³/h. m. A captação é feita através de estação de bombeamento, a partir de um canal de aproximação, localizada na margem esquerda do reservatório de Itaparica, a qual alimenta um reservatório, cujo volume é de aproximadamente 54.000 m³. O reservatório por sua vez alimenta por gravidade as adutoras principais, redes de distribuição e parcelares (HIDRO SONDAS, 2012).

As principais culturas produzidas em Icó Mandantes estão classificadas em dois grupos: as culturas permanentes representadas por fruteiras como banana, coco, manga, goiaba, maracujá e mamão; e as culturas temporárias ou de ciclo curto como abóbora, feijão, jerimum, melancia, milho, amendoim e coentro (PLANTEC, 2012). O Bloco 04 começou a produzir em dezembro de 1994 com 8.937 ha, dos quais 812 irrigáveis. Já o Bloco 03 começou a produzir em março de 1998, com 14.981 há, sendo 1.315 há irrigáveis (CARVALHO, 2009).

O sistema de drenagem agrícola é configurado por uma rede de drenos superficiais e subterrâneos externos aos lotes agrícolas. Os drenos superficiais são abertos e apresentam dois tipos de estruturas construtivas: canais de concreto-alvenaria ou são simplesmente escavados no solo aproveitando o relevo e declividade natural do terreno. Em função do destino do fluxo da água, os drenos são classificados em: primários: conduzem a água direto para o reservatório de Itaparica; secundários: direcionam o fluxo de água até um dreno primário e terciários: direcionam o fluxo de água até um dreno secundário.

2.2 RECURSOS HÍDRICOS E MONITORAMENTO AMBIENTAL

No Estado de Pernambuco, a maioria das águas usadas para abastecimento provém de reservatórios originários de rios que, por percorrerem várias cidades, encontram-se em processo de degradação concentrando grandes quantidades de poluentes que comprometem a qualidade da água usada para o consumo da população (SOBRAL et al., 2006).

Um dos principais projetos em execução no Brasil é o *Projeto de Integração do Rio São Francisco com as Bacias Hidrográficas do Nordeste Setentrional*. Trata-se de um empreendimento do Governo Federal, sob a responsabilidade do Ministério da Integração Nacional, destinado a assegurar a oferta de água, em 2025, a cerca de 12 milhões de habitantes de pequenas, médias e grandes cidades da região semi-árida dos estados de Pernambuco, Ceará, Paraíba e Rio Grande do Norte. Neste projeto, o rio será integrado ao Semi-Árido Setentrional por meio de dois canais, que conduzirão água até os principais açudes da região, possibilitando seu uso com garantia de atendimento. Um dos canais terá seu ponto de captação no reservatório de Itaparica (BRASIL, 2004). Entretanto, de acordo com Melo (2006), isso pode aumentar os conflitos de uso múltiplo da água e do solo no entorno, devido à ampliação das atividades agrícolas e da aquicultura que vem sendo realizadas pelos moradores locais próximo às margens do lago, as quais contribuem para o acréscimo nos níveis de agrotóxicos e fertilizantes na água dos reservatórios.

Frente a estas transformações, algumas medidas de monitoramento são adotadas para determinar a qualidade da água do rio, como por exemplo, as análises físico-químicas e bacteriológicas que revelam a viabilidade da água para o consumo humana, como base na Resolução CONAMA n. 375/2005 (BRASIL, 2005). No entanto, estes parâmetros, quando analisados individualmente, pode subestimar a magnitude real dos danos causados aos ambientes aquáticos (KARR e CHU, 1999; KIELING-RÚBIO, 2015).

Além disso, quando a contaminação ambiental é associada ao uso de pesticidas, existe uma dificuldade em detectar e avaliar este tipo de poluição, pois estes obedecem a uma dinâmica difusa e com variação temporal, podendo provocar um quadro de contaminação baixo e contínuo, que nem sempre é captado pelos métodos de screening químicos, uma vez que esses registram apenas o instante exato em que foram coletadas as amostras e não acompanham a variação temporal e espacial da contaminação (ARIAS, 2007).

O fato de essas concentrações apresentarem-se baixas não implica em uma menor preocupação, pois as mesmas já antecipam a degradação do ambiente aquático e são capazes de prever a contaminação humana através do consumo de organismos aquáticos existentes nesses ecossistemas. Portanto, existe uma necessidade de promover o desenvolvimento sustentável não apenas como garantia dos recursos naturais para as gerações futuras, mas sobretudo como uma garantia de vida para a geração atual, inclusive aquelas populações mais vulneráveis (AZEVEDO, 2010).

Diante disso, evidencia-se a necessidade de um constante monitoramento ambiental, no entanto, alguns métodos exigem mão de obra especializada e alto custo, além de requer um curto intervalo de tempo entre a coleta de água e a análise para detectar alguns pesticidas, como os Organofosforados que são mais voláteis, fato que tornaria ainda mais inviável para os ecossistemas localizados distantes dos grandes laboratórios, como é o caso do Nordeste, que conta com um pequeno número de laboratórios que oferecem métodos capazes de avaliar pesticidas organofosforados e carbamatos em água como a cromatografia gasosa (GC), cromatografia líquida de alta performance (HPLC) ou espectrofotometria de massa (MS), em relação as regiões Sul e Sudeste do país.

2.3 BIOMONITORES

Nas últimas décadas, mais e mais xenobióticos têm prejudicado o desenvolvimento físico, químico e os processos biológicos dos ecossistemas, resultando em perturbações graves (BRITO et al. 2012). Os ecossistemas aquáticos estão entre os que mais sofrem os

efeitos da poluição, tanto pelo carreamento e acumulação/deposição dos contaminantes nos corpos d'água (TOMITA e BEYRUTH, 2002), quanto pela sensibilidade dos organismos, razão pela qual espécies desses meios têm se mostrado de grande utilidade como bioindicadores e biomonitores (RODRÍGUEZ-FUENTES e GOLD-BOUCHOT, 2000; FULTON e KEY, 2001; JARRARD et al., 2004; MONSERRAT et al., 2007). Enquanto os bioindicadores, provêm informações sobre a qualidade do ambiente ou de suas modificações, as "respostas" dos biomonitores possibilitam quantificar tais modificações (WOLTERBEEK et al., 1995)

Assim, os programas de biomonitoramento utilizando organismos aquático, como por exemplo os peixes, tornaram-se relevante, principalmente porque os efeitos da poluição agrícola e urbana nesses organismo pode ser avaliada isolada ou cumulativamente. Os resultados de estudos com biomonitoramento podem ser de grande valia para programas de conservação e as leis reguladoras (BRITO et al. 2012)

Para Zhou et al. (2008), estes estudos têm vantagens óbvias sobre convencional análises químicas dos ambientes aquáticos; elas pode: (1) detectar os efeitos subletais nos organismos; (2) apresentar respostas integrativas para misturas complexas de substâncias poluentes; e (3) ser utilizado para análises preditivas de poluentes, mesmo em concentrações não detectáveis por métodos analíticos.

2.4 A ESPÉCIE EM ESTUDO

O tucunaré é um peixe pertencente ao gênero *Cichla* sp. (Teleostei, Actinopterygii, Cichlidae), incluído entre as espécies de importância comercial que habita a região de estudo. Originário da bacia amazônica, o tucunaré é uma espécie de hábito alimentar carnívoro e tem demonstrado considerável eficiência no controle de peixes invasores em represas. Estas características, aliadas à excelência da qualidade da sua carne, tornam o tucunaré uma espécie potencialmente utilizável em piscicultura intensiva (SILVA et al., 1980; NASCIMENTO et al., 2001).

No presente estudo, a espécie escolhida como fonte de acetilcolinesterase foi o tucunaré (*Cichla ocellaris*). Sua utilização prende-se não apenas à importância econômica e facilidade de aquisição, mas também por ser uma espécie com a qual estudos preliminares de caracterização bioquímica no laboratório de Enzimologia do Departamento de Bioquímica da UFPE, levam a crer que se trata de uma fonte adequada de acetilcolinesterase para o

biomonitoramento de pesticidas. Além disso, o tucunaré é uma espécie sedentária e não migratória, característica capaz de evidenciar diferenças entre os locais de amostragem.

2.5 BIOMARCADORES

Como citado anteriormente, a avaliação da qualidade ambiental em locais contaminados pode ser feita através de análises químicas que fornecem informações sobre a natureza dos contaminantes e as suas concentrações no ambiente. No entanto, estas análises não podem prever a biodisponibilidade e seus potenciais efeitos na biota. Em vez disso, esses fatores devem ser avaliados usando abordagens ecotoxicológicas como bioensaios de toxicidade (ARAÚJO et al., 2014)

Estes ensaios são fáceis de executar e representa-se como uma ferramentas para caracterizar os efeitos da poluição no local podendo fornecer dados sobre a saúde integrativa da biota e os riscos de exposição para as populações humanas, e eles têm recentemente sido usados em numerosos estudos biomonitoração (ABDEL-MONEIM et al 2012;. BRITO et al 2012;. AZEVEDO et al. 2013).

Segundo OOST et al. (2003) os biomarcadores são subdivididos como: biomarcador de exposição (detecta e quantifica a presença do xenobionte, de seus metabólitos ou de sua interação com componentes moleculares ou celulares em compartimentos do organismo; infere exposição prévia e fornece os índices de bioacumulação da biota, estes determinados por métodos bioquímicos e de química analítica), biomarcador de efeito (parâmetros bioquímicos ou fisiológicos mensuráveis que correspondam a alterações em níveis molecular, celular ou tecidual que permitam inferir efeito adverso, prejudicial ao operar normal do organismo saudável, efeito pré-clínico, subletal ou até letal) e biomarcador de susceptibilidade (indica a habilidade inerente ou adquirida por um organismo de responder à exposição a um xenobionte; elucida variações no grau de resposta diferencial entre organismos e demonstra a tolerância fisiológica adquirida ou controlada por expressão gênica hereditária).

Os biomarcadores bioquímicos também podem expressar resultados importantes de como os peixes processam a detoxificação de poluentes e sua biotransformação para facilitar a excreção de xenobióticos (VAN DER OOST et al., 2003). A avaliação desse processos de defesa no organismo pode ser feita através da mensuração das enzimas e proteínas envolvidas no processo de biotransformação e dos antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos, que neutralizam as espécies do oxigênio (EROS) geradas durante a biotransformação (Martinz, 2006).

O uso destes biomarcadores oferece algumas vantagens, pois são, normalmente, os primeiros a serem alterados, apresentam boa sensibilidade e relativa especificidade. Por detectarem alterações enzimáticas, são considerados como sistemas de aviso precoce, indicando a contaminação do ambiente menos em baixo nível de poluente, antes que ocorram danos mais severos aos organismos e, possivelmente, ao ecossistema (MCCARTHY & SHUGART, 1990).

Algumas agências ambientais, como a EPA (Environmental Protection Agency) e o ICES (International Council for Exploration of the Sea) recomendam a incorporação da análise de biomarcadores aos novos programas de monitoramento, como metodologias complementares, expressando o grau de toxicidade causado por xenobiontes aos organismos ambientais.

2.6 BIOMARCADOR NEUROTÓXICO

2.6.1 Colinesterase

Nos vertebrados podemos encontrar dois tipos de colinesterases (ChEs): Acetilcolinesterase (AChE) e a Butirilcolinesterase ou pseudocolinesterase (BChE), que difere na sua especificidade de substrato. No por um lado, o AChE hidrolisa acetilcolina mais rápido em comparação com outros ésteres de colina e é menos ativa para a hidrólise da butirilcolina. Em contraste, a BChE é altamente eficiente na hidrólise tanto da butirilcolina como a hidrólise da acetilcolina. Em peixes, o AChE é predominante em tecidos cerebrais e musculares, enquanto é BChE principalmente presente no fígado e no plasma (HABIG e GIULIO, 1991).

A acetilcolina é o mais importante neurotransmissor que modula a transmissão do impulso nervoso. Portanto, ela precisa ser liberada nas fendas sinápticas para garantir a manutenção e repetições das ações no interior do sistema nervoso central e ao nível das terminações nervosas periféricas. A acetilcolina liga-se a um receptor e é hidrolisada pela AChE, que está nas junções neuro-sinápticas, a ácido acético e colina. A reação de hidrólise se dá pelo ataque nucleofílico de aminoácidos existentes no sítio ativo da enzima AChE ao carbono do grupo carbonila, do grupo do neurotransmissor da acetilcolina. O resultado é a hidrólise da enzima que sofre acetilação gerando acetato e recuperando seu centro ativo.

Os agrotóxicos podem atuar como inibidores da acetilcolinesterase de duas formas: (1) inibindo a enzima de forma reversível, por bloqueio competitivo da hidrólise do substrato que alcançou o centro ativo, mas não interage com a enzima, ou de forma irreversível, por

acetilação do grupo OH- do aminoácido serina, presente no sítio ativo, formando um éster que, sendo uma molécula mais estável que o acetato livre, dificilmente abandonará o centro ativo, inativando a capacidade catalítica da mesma (SOREQ e HEIDMAN, 2006; HOUGHTON, RENY, HOWESM, 2006; ZIMMERMAN e SOREQ, 2006).

Por outro lado, a precisa função fisiológica da BChE não é conhecida principalmente porque a inibição da BChE não nenhuma importância farmacológica. Apesar disso, a BChE tem uma ampla distribuição através de vários tipos de tecido, incluindo soro, fígado, coração, cérebro, endotélio vascular e no sistema nervoso. Essa distribuição generalizada pode sugerir que BChE tem várias funções entre tecidos dentro de um organismo (MACK e ROBITZKI, 2000). Por exemplo, ela tem sido proposta como uma enzima de marcação para as células de apoio ou células não - neuronais (PEAKALL, 1992). Além disso, o fato da BChE hidrolisar compostos hidrofóbicos e hidrofílicos contendo o ácido carboxílico ou fosfórico ésteres, torna ela um agente de remoção endógeno para compostos anticolinérgicos. Em outras palavras, a BChE assume um papel de detoxificadora para estes agentes pois ela evita a inibição da AChE protegendo-a, uma vez que a AChE fisiologicamente apresenta um papel vital nos seus locais de atuação (PEZZEMENTI et al, 1991; COKUGRAS, 2003).

Portanto, a caracterização de ChEs é importante uma vez que seu nível de atividade varia muito entre órgãos dentro e individual, bem como entre espécies. E a caracterização da AChE apenas como uma enzima do sistema nervoso colinérgico é uma simplificação. Em primeiro lugar, a BChE é freqüentemente encontrado no sistema nervoso em desenvolvimento enquanto AChE aparece em fases posteriores do desenvolvimento. Em segundo lugar, ambas, a AChE e a BChE, são encontrados em células hematopoiéticas, e sua presença pode ser correlacionada com a diferenciação celular. Finalmente, a AChE carrega novos antígenos de superfície celular que pode desempenhar um papel na comunicação célula-célula

Pesticidas como organofosforados e carbamatos além de inibir colinesterase também são apresentados na literatura como compostos capazes de alterar o sistema de defesas antioxidante em várias espécies, inclusive peixes.

2.7 BIOMARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO

Os radicais livres (RLs) são átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons não pareados em sua órbita externa, geralmente pela perda ou ganho de elétrons (oxirredução) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Espécies reativas de oxigênio (ERO) ou espécies reativas de nitrogênio (ERN) são compostos igualmente reativos quanto os radicais livres,

porém não possuem elétrons desemparelhados na órbita externa, e portanto não podem ser classificados como radicais livres, sendo então chamadas de maneira mais ampla como espécies reativas de oxigênio (ERO) ou espécies reativas de nitrogênio (ERN), um exemplo é o peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

A produção contínua de RLs e EROs durante os processos metabólicos levou ao desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidante. Estes têm como objetivo limitar os níveis intracelulares das espécies reativas e controlar a ocorrência de danos (SHAMI e MOREIRA, 2004). Qualquer substância que, presente em menores concentrações que as do substrato oxidável, seja capaz de atrasar ou inibir a oxidação, deste de maneira eficaz, é denominada antioxidante (SILVA, et al., 2012).

As defesas antioxidantes podem ser divididas em enzimáticas e não enzimáticas (HALLIWELL, et al., 2004). As enzimáticas removem ou impedem a geração de espécies reativas. Entre as principais enzimas antioxidantes estão a superóxido dismutase, a catalase e a glutathione peroxidase (DRASTICHOVA, et al., 2012). Já os compostos não enzimáticos são sintetizados pelo organismo como defesa antioxidante, por exemplo, a bilirrubina, o ácido úrico, a melatonina e a glutathione, agem a fim de manter o estado de equilíbrio celular (SINGH, et al., 2004; GORDON, 2011).

Porém, estas defesas antioxidantes tornam-se incapazes de evitar danos celular e molecular quando o estresse oxidativo contribui para a formação de radicais livres em excesso, resultando em efeitos deletérios ao organismo, seja pelo descontrole do sistema antioxidante; perturbação tecidual, alterando macromoléculas como proteínas, DNA e lipídeos; ou, até mesmo, a morte celular mediante os processos de necrose e apoptose (HALLIWELL, 2001).

Uma variedade de poluentes ambientais, dentre eles os pesticidas e metais pesados, podem provocar um aumento na produção de radicais livres em diversos organismos aquáticos, como os peixes (AHMAD et al., 2000; ÜNER et al., 2005). Se a capacidade antioxidante das defesas enzimáticas e não enzimáticas não for suficiente para neutralizar a formação de ERO oriundos da metabolização de produtos endógenos e exógenos, isto causa ao organismo o estresse oxidativo, o qual afeta o funcionamento normal da célula, podendo gerar danos em proteínas, inativação de enzimas, peroxidação lipídica e quebras no DNA (AMADO et al., 2009).

O estresse oxidativo tem sido associado a uma ampla variedade de condições patológicas, e sabe-se que sua indução ocorre facilmente através da presença de metais

tóxicos (ALMAZAN et al., 2000; BUSH, 2000). Estudos *in vivo* e *in vitro* utilizando culturas de células nervosas expostas ao MeHg, têm demonstrado aumentos significativos na formação de espécies reativas (GASSO et al., 2001; PARK et al., 1996; SHANKER et al., 2004). Em células hepáticas de peixes, o aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio, em decorrência do estresse oxidativo, causa danos através da oxidação de lipídios, proteínas, açúcares, DNA e RNA (DEMPLE e LEVIN, 1991; LITTAUER e DE GROOT, 1992; CARACENI et al., 1997; ZULUETA et al., 1997; ZAR et al., 1998).

Na maioria das espécies animais o fígado é o principal órgão onde ocorre a biotransformação de xenobióticos. A biotransformação consiste na conversão de compostos apolares em compostos polares e mais solúveis em água, mais facilmente excretados (MALMSTRÖM et al., 2004). Geralmente, os biomarcadores de efeito mais sensíveis são alterações nos níveis e atividades de enzimas de biotransformação (MARTINEZ, 2006).

Portanto, fica evidente o balanceamento enzimático e não enzimático do sistema antioxidante no equilíbrio redox das células dos peixes, tornando-se importantes para a compreensão das defesas biológicas desses organismos frente ao estresse oxidativo, relacionado aos efeitos deletérios de poluentes ambientais como pesticidas e metais pesados, para os quais, tais mecanismos, são apontados e utilizados como marcadores de exposição (MONTEIRO et al., 2006).

2.7.1 Lipoperoxidação (LPO)

A peroxidação lipídica é considerada um processo fisiológico natural de suma importância na maturação celular (SCHEWE; RAPOPORT; KÜHN, 1986). Contudo, determinadas classes de contaminantes, podem acarretar efeitos deletérios nesse processo (SEVANI; URSINI, 2000), levando a um comprometimento no funcionamento da célula (BAKER; KRAMER, 1999), sendo um dos principais danos causados pelo estresse oxidativo. Este dano pode causar destituição dos fosfolipídeos das membranas, por serem regiões susceptíveis a reações de oxidação (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003), destituição da função de organelas essenciais, tais como o processo de transporte, a manutenção de gradiente de metabólitos e íons e a transdução de sinais mediada por receptores (MEAGHER; FITZGERALD, 2000).

Decorrente da lipoperoxidação, a membrana pode perder sua integridade devido a alterações no fluxo de íons através da membrana em decorrência do aumento de sua permeabilidade, influxo excessivo de cálcio, alterações no transporte de Na^+/K^+ e ativação de

enzimas próteses, nucleases (MEAGHER; FITZGERALD, 2000; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

A peroxidação lipídica tem se mostrado uma ferramenta de sucesso como uma avaliação de estresse oxidativo induzido por xenobióticos, em espécies expostas in vivo a uma variedade de substâncias químicas como metais (ferro, cádmio, mercúrio e cobre) e pesticidas como paraquat, malation, deltametrina e glifosato (KELLY et al., 1998; SAYED et al., 2003; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; VALAVANIDIS et al., 2006), pois através dela podemos inferir os danos causados à célula pelo estresse oxidativo (KAPPUS, 1987).

2.7.2 Catalase

Uma vez exposto a poluição, organismos são submetidos a condições de estresse, o que pode levar a produção de radicais livre, especialmente espécies reativas de oxigênio. Para minimizar tais danos, o organismo reage tentando um metabolismo de depuração para minimizar os danos celulares causados por esses radicais, o sistema de defesa antioxidante, podendo remover as espécies reativas geradas pelo metabolismo e xenobiontes.

Quando há um estresse oxidativo, muitos ânions peróxidos são liberados e são transformados em peróxidos de hidrogênio que em seguida são decompostos pela catalase (GUL et al., 2003). Esta enzima antioxidante catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. É encontrada em todas as células aeróbicas, em altos níveis no fígado, rim e sangue, e baixos níveis no tecido conjuntivo e cérebro (CHEN, 2003).

Entre as enzimas degradantes de H_2O_2 , a CAT tem sido considerada a mais eficiente, em termos energéticos, pois degrada os peróxidos de hidrogênio que são gerados rapidamente e, ainda, promovem um ganho de energia celular. A concentração da CAT, em mamíferos, pode variar de acordo com o tipo celular e a concentração de peróxido de hidrogênio (SCANDALIOS et al., 2005). Muitos estudos têm utilizado a enzima CAT como um biomarcador de estresse oxidativo induzido por contaminantes ambientais, para avaliar os possíveis danos oxidativos causados por inseticidas organofosforados (ALMEIDA et al., 2010; SHAD; IQBAL, 2010) e herbicidas (NWANI et al., 2010), e também para avaliar amostras de água impactadas por efluentes urbanos e industriais (TABREZ; AHMAD, 2011; TSANGARIS et al., 2011).

2.7.3 SOD

A superóxido dismutase (SOD) é uma metaloenzima essencial ao sistema de defesa antioxidante, pois catalisa a dismutação do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), formando peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), por sua vez, será degradado pela catalase ou pela glutatona peroxidase. Existem três formas conhecidas de SOD, a Cu, Zn-SOD, presente no citoplasma de eucariontes, a Mn-SOD, presente em bactérias e mitocôndrias e a Fe-SOD, presente apenas em bactérias (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

2.8 BIOMARCADORES GENÉTICOS

Mesmo antes da descrição da estrutura do DNA, já era evidentes de que produtos químicos, físicos e biológicos poderiam interagir com o material genético, resultando em mutações, que estão associados ao câncer e instabilidade genômica (ARALDI, 2015).

Contudo, foi na década de 70 que houve o desenvolvimento de novos métodos e técnicas para diagnosticar e monitorar a presença de substâncias nocivas ao DNA associados com a poluição aquática. Os testes avaliam lesões no DNA que, se forem reparadas corretamente não acarreta maiores consequências para o organismo. Porém, caso isso não aconteça, tais lesões podem constituir aberrações cromossômicas, conduzindo a célula à morte e levando o organismo a condições fisiopatológicas severas (JHA, 2008).

Entre os testes de genotoxicidade disponíveis, ensaio do cometa (CA) e ensaio de micronúcleos (MNA) são reconhecidos devido à sua robustez, sensibilidade e poder estatístico para avaliar quebras de DNA, o que pode ser considerados marcas de mutagenicidade. Além disso, Atualmente estudos apontam que a associação da CA e MNA é o melhor teste da bateria para avaliar o potencial mutagênico, desde ambos os ensaios são muito sensíveis, simples e permitem detectar quebras em níveis cromáticas e cromossômicas, respectivamente (ARALDI, 2015).

Considerando a importância do monitoramento constante, estudos genotóxicos fornecer rápido, preciso e barato procedimentos para determinar as respostas a putativa contaminações. Tais estudos permitem avaliar o efeito de substâncias em células, tecidos e órgãos e deduzir a causas e efeitos dos distúrbios metabólico (PADRANGI et al. 1995; ADAM et al. 2005; ERGENE et al. 2007; ADAM et al. 2010; ADAM et al. 2013).

2.8.1 Micronúcleo

O micronúcleo caracteriza-se por fragmentos de cromátides que foram quebradas ou alteradas quando a sua distribuição na célula durante a anáfase que consiste em uma fase da

divisão celular onde os cromossomos segregam para os polos da célula. Nesta etapa da divisão, efeitos sobre o fuso cromático ou cromátides, impedem que os cromossomos acompanhem a migração para os pólos da célula, resultando em fragmentos que podem ser notado na telófase, já que os fragmentos das cromátides ficam fora do núcleo das células filhas, formando o micronúcleo no citoplasma de tais células. A observação destas alterações embasam o teste do micronúcleo (LEDEBUR; SCHMID, 1973), como representado na figura 1.

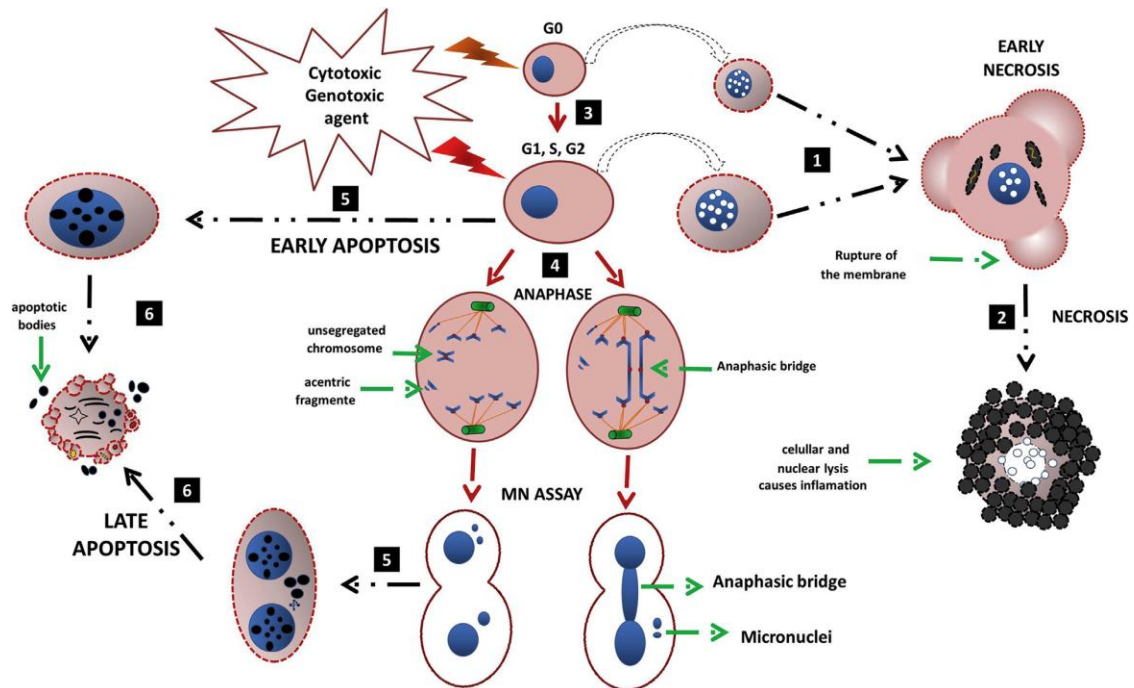
O aumento da frequência de micronucleados nas células sugere que o efeito de alguns xenobióticos presente no ambiente interfere na fisiologia normal, diminuindo assim adaptação às rápidas mudanças drásticas no ambiente natural ou artificial (PADRANGI et al., 1995; ADAM, et al 2013).

Os organismos aquáticos, como os peixes, acumulam poluentes diretamente da água ou indiretamente pelo alimento (SASAKI et al., 1997; ANDRADE et al., 2004) Os eritrócitos destes animais são muito utilizados em estudos genotoxicológico (AL-SABATI e METECALFE, 1995; MISSINI El et al., 1996; HAYAHY El et al., 1998).

LANDOLT e KOCAN, (1983) classificaram o teste do micronúcleo como uma das mais promissoras, barata e rápida técnica, aplicável para avaliação a exposição por contaminantes para peixes marinhos e de água doce.

Segundo BOLOGNESI e HAYASHI (2011), em peixes, os micronúcleos podem ser visualizados em vários tipos celulares, embora o uso de eritrócitos do sangue periférico seja mais amplamente utilizado, pois evita a complexidade dos procedimentos de preparação do material biológico e o sacrifício desses animais, além de alta taxa de divisão celular, o que possibilita o rápido acesso aos efeitos dos agentes genotóxicos.

Figura 1. Via diferente de drogas mutagénicos



Fonte: ARALDI, 2015. Os agentes citotóxicos podem induzir uma fase precoce de necrose (1), o qual evolui a necrose (2). Agentes genotóxicos podem induzir danos de DNA durante G0 para a fase S (3), que pode induzir apoptose (5), resultando na formação de corpos apoptóticos, durante a apoptose tardia (6) ou, para deixar dano cromossômico, resultando em formação de micronúcleos pelas fraturas e / ou interrupção do aparelho mitótico (4). Micronúcleos podem ser destinados à apoptose (5 e 6).

2.8.2 Ensaio Cometa

O Ensaio Cometa é um teste amplamente utilizado no biomonitoramento estratégico de agentes genotóxicos por permitir detecção de danos em células individualizadas, além de apresentar sensibilidade na detecção de lesões mesmo em organismos expostos a concentrações baixas de toxicidade (PRÁ et al., 2005). Ainda, requer uma pequena quantidade amostral, apresentando bons resultados a partir de um pequeno número de células analisadas (DA SILVA; HEUSER; ANDRADE, 2003). Em organismos aquáticos, o Ensaio Cometa é frequentemente aplicado em células sanguíneas de peixes. Devido à sua importância na cadeia alimentar, a utilização desses animais no monitoramento da poluição de ambientes aquáticos é de extrema relevância (BOLOGNESI e HAYASHI, 2011). Peixes são organismos bioconcentradores, e muitos contaminantes, mesmo em baixas concentrações, podem afetar sua fisiologia e capacidade de sobrevivência (GRISOLIA et al., 2009). Além disso, parecem responder à xenobióticos da mesma maneira que vertebrados superiores, sendo rotineiramente utilizados como organismos sentinela em estudos de monitoramento de água doce (POLARD et al., 2011).

3 RESULTADOS

3.1 EFEITOS DA AGRICULTURA E AQUICULTURA INTENSIVA EM UM RESERVATÓRIO DO RIO SÃO FRANCISCO UTILIZANDO PARÂMETROS DE DANOS GENÔMICOS EM CICHLA OCELLAIS

Kaline Catiely Campos Silva¹; Caio Rodrigo Dias de Assis¹ Marlyete Chagas de Araújo¹, Kelma Sirleide de Souza¹, Anderson Rodrigues Balbino de Lima²; Ranilson de Souza Bezerra¹; Monica Lúcia Adam².

¹Laboratório de Enzimologia (LABENZ), Departamento de Bioquímica e Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420, Recife-PE, Brazil.

²Laboratório de Genômica Evolutiva e Ambiental (UFPE).

³Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal de Alagoas (UFAL). Campus/ Penedo

Corresponding author:

Monica Lúcia Adam

Universidade Federal de Pernambuco - Centro Acadêmico de Vitória de Santo A, Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão.

Rua do Alto do Reservatório, S/N

Boa Vista - Vitória de Santo Antão, PE - Brasil

CEP: 55608680

Telefone: (81) 35233351

email: mogabrod@gmail.com

EFEITOS DA AGRICULTURA E AQUICULTURA INTENSIVA EM UM RESERVATÓRIO DO RIO SÃO FRANCISCO UTILIZANDO PARÂMETROS DE DANOS GENÔMICOS EM *CICHLA OCELLAIS*

RESUMO

Lagos e rios que cortam cidades e tem ampla utilidade, recebem constantes descargas de multiestressores. Contaminações assim têm sido avaliada através da mensuração de danos de DNA de organismos bioindicadores expostos às águas poluídas. A descarga de poluentes principalmente de fontes agrícolas, por possuírem ação genotóxica, podem quebrar a fita de DNA, ocasionando lesões genômicas que podem desencadear processos mutagênicos e carcinogênicos em animais, inclusive a espécie humana. O presente estudo teve como objetivo avaliar o dano genômico em *Cichla ocellaris* próximo a três projetos de irrigação, Apolônio Sales (AS), Barreiras (B) e Icó-Mandantes (IM), no Lago de Itaparica por meio do ensaio cometa e teste do micronúcleo. Foi coletado sangue periférico de 30 exemplares jovens de *C. ocellaris*, capturados nos pontos amostrais durante as estações chuvosa e seca dos anos de 2015 e 2016. Para o teste do micronúcleo 1000 células foram analisadas em microscópio óptico. Para o ensaio do cometa, foram contadas 100 células por animal em microscópio de fluorescência e a obtenção do escore se deu de acordo com o dano encontrado. Com os resultados obtidos foram feitas comparações espaciais e sazonais. À análise estatística dos resultados foi aplicada ANOVA (nível de significância 5%). O impacto genotóxico foi confirmado pela detecção de microlesões no DNA por meio do ensaio cometa, e pela alta frequência de macrolesões (MN). No ano de 2015, no período chuvoso, o ensaio cometa apresentou diferenças significativas entre os locais de coleta. O maior índice de dano ocorreu no B ($229,88 \pm 87,62$) diferindo do AS ($p = 0,0001$) e do IM ($p = 0,01$). No ano de 2016, no período chuvoso, o índice de dano entre o controle e os demais pontos amostrados foi bastante significativo ($p < 0,0001$). A diferença entre os pontos foi significativa apenas entre o IM e os demais. AS e B não apresentaram diferenças. Os danos no DNA foram mais frequentes em 2016 com maior significância para o IM e B. No período seco deste mesmo ano, o IM apresentou-se com danos mais frequentes que os demais pontos analisados ($p < 0,0001$). O IM foi o ponto que apresentou o maior índice de dano no decorrer dos anos estudados, como maior índice de danificação em 2016 ($p = 0,000134$). O teste do MN não mostrou diferença quando comparado dentro da mesma estação durante os dois anos de estudo, mas a diferença foi significativa entre os pontos amostrados. Durante o período chuvoso de 2015 AS e B ($p = 0,004$) e no período seco deste mesmo ano o IM foi significativamente diferente dos demais ($p = 0,026$). Os resultados obtidos neste trabalho apresentaram forte relação com as características da ocupação e das atividades insustentáveis desenvolvidas em cada projeto de irrigação, que são marcados por várias irregularidades desde suas origens.

Palavras chaves: Genotoxicidade, *Cichla ocellaris*, Lago de Itaparica

1 INTRODUÇÃO

Mais de 45.000 grandes reservatórios foram construídos no mundo para armazenamento da água (EMBRAPA, 2001). Reservatórios artificiais, construídos a partir de barramentos de rios, vem sendo utilizados no mundo inteiro, há milhares de anos e

desempenham papel relevante na gestão de recursos hídricos pela capacidade de estocar água e atender a diversos usos. Ao longo de sua extensão, o rio São Francisco possui uma série de oito reservatórios de acumulação de água que cortam várias cidades e possui ampla utilidade, fato que intensifica os problemas ambientais devido às irregularidades no seu uso e desordenada ocupação de suas margens (Carvalho, 2009).

O reservatório de Itaparica, localizado no estado de Pernambuco, nordeste do Brasil, inserido neste contexto, possui uma grande área de agricultura irrigada no seu entorno, devido, sobretudo, ao reassentamento da população remanejada para perímetros irrigados como forma de mitigar impactos negativos sobre essa população, ocasionados pela construção da usina hidroelétrica Luís Gonzaga (Sobral, 2006). Além das práticas inadequadas de irrigação e fertilização do solo, que favorecem a contaminação da água por agroquímicos, existem ainda uma forte atividade aquícola e lançamentos de efluentes sem tratamento que comprometem ainda mais a qualidade da água.

Sendo assim, os organismos inseridos em ambientes como este, podem, por ventura, ser expostos a numerosos contaminantes conjuntamente, que podem interagir de maneiras diferentes entre si e provocar reações adversas nos organismos, como aditivo, efeito sinérgico ou antagônicos (Eaton e Gilbert, 2008).

Contaminações como estas, têm sido avaliadas através da mensuração de danos de DNA de organismos bioindicadores expostos às águas poluídas. A descarga de poluentes, principalmente de fontes agrícolas, por possuírem ação genotóxica, podem quebrar a fita de DNA, ocasionando lesões genômicas que podem desencadear processos mutagênicos e carcinogênicos em animais, inclusive na espécie humana.

Os peixes são listados como bons bioindicadores, sendo utilizados no monitoramento da qualidade da água (Fontaínhas-Fernandes 2005, Çavas & Könen 2008, Osman 2010), e na avaliação de efeitos genotóxicos e mutagênicos dos variados xenobióticos no meio ambiente, por meio do teste do micronúcleo e ensaio do cometa (Cestari et al. 2004, Rocha et al. 2009, Barbosa et al. 2010).

O teste de micronúcleo (MN) é um importante biomarcador *in vivo* e *in vitro* amplamente utilizado para detectar danos em populações expostas a agentes genotóxicos. O micronúcleo pode se formar por meio de dois mecanismos: fragmentos de cromossomos (clastogêneses) ou rompimento do aparelho mitótico (aneugêneses), além de ser um teste altamente sensível, simples, versátil e demanda de baixo custo de tempo e investimento (Araldi et al., 2015). Em peixes, os eritrócitos periféricos são utilizados no teste de

micronúcleo em pesquisas *in situ*, sendo assim um teste muito promissor no controle de ambientes aquáticos, principalmente dos reservatórios para fins de consumo humano (Buchini et al., 2004).

O Ensaio Cometa apresenta potencial de aplicação quase ilimitado para o biomonitoramento ambiental, com vários organismos aquáticos sendo utilizados para este fim (Klobucar et al., 2003, Valverde & Rojas 2009, Nwani et al. 2010). Esta técnica é importante pois complementa as análises do teste do micronúcleo (Rothfuss et al. 2010).

O presente estudo teve como objetivo monitorar o potencial genotóxico do Lago de Itaparica, em três projetos de irrigação, e avaliar a influência das diferentes características ecológicas dos pontos amostrados, sobre os possíveis danos. A espécie escolhida foi o tucunaré (*Cichla ocellaris*), que segundo Fontenele, (1948); Silva et al., (1980) é um peixe pertencente ao gênero *Cichla* sp. (Teleostei, Actinopterygii, Cichlidae), incluído entre as espécies nativas de grande importância para a pesca esportiva. Originário da bacia amazônica, o tucunaré é uma espécie de hábito alimentar carnívoro e tem demonstrado considerável eficiência no controle de peixes invasores em represas. Sua utilização prende-se não apenas à importância econômica e facilidade de aquisição, mas também por ser uma espécie sedentária e não migratória, características capazes de evidenciar diferenças entre os locais de amostragem (Silva et al., 2012).

2 METODOLOGIA

2.1 ÁREA DE ESTUDO

O Reservatório de Itaparica, inserido na Bacia do Rio São Francisco no semi-árido do nordeste brasileiro, tem um significado particular para captação de água potável, irrigação, aquicultura, geração de energia hidroelétrica e outros fins de exploração da água. Possui uma entrada regulada de $2060 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$, um comprimento de 149 Km, profundidade máxima de 101 m e a profundidade média é de 13 m, com tempo de residência média de 60 dias (CHESF, 2011). De acordo com a classificação de Köppen, o clima da área é semi-árido de estepes BShw' (clima semi-árido quente e seco com chuvas de verão-outono), com temperatura média anual de 26°C , e se caracteriza pela alta evaporação, chuvas médias anuais entre 410 e 610 mm, com duas estações sazonais definidas. O período seco ocorre no inverno e a altura de chuva do mês úmido alcança dez vezes a altura de chuvas do mês mais seco. Dados da Codevasf (2004) indicam que o período chuvoso, nesta área, estende-se de janeiro a maio, resultando subsequentemente em uma estação seca com duração de sete meses.

O reservatório de Itaparica entrou em operação, em 1988, com a inundação de mais de 800 km² da antiga cidade de Petrolândia que teve suas terras submersas, acumulando cerca de 11 bilhões de metros cúbicos de água para a formação do lago de Itaparica (fig. 01), onde está instalada a Usina Hidrelétrica Luíz Gonzaga. O município é atravessado pelo rio São Francisco e por afluentes temporários de menor importância: riacho dos Mandantes e Barreiras, onde foram reassentados os moradores da nova cidade através da criação de três principais Projetos Agrícolas: Barreiras (B), Apolônio Sales (AS) e Icó Mandantes (IM) (Tabela. 01).

2.1.1 Amostras Biológicas

Nas proximidades dos projetos acima citados foram coletados 10 exemplares jovens de *Cichla ocellaris* em cada ponto, durante as estações chuvosa e seca dos anos de 2015 e 2016. Por não existir uma região livre de contaminação, foi realizada a coleta de 10 exemplares dessa mesma espécie e aclimatados na sede da Codevasf em Penedo-AL, para ser usado como controle negativo, depois de um período de depuração. Os resultados encontrados no presente trabalho também foram comparados com os resultados encontrados na literatura científica referente ao diagnóstico de impacto no Lago Paranoá-DF utilizando uma espécie do mesmo gênero, *Cichla termensi*.

Figura 1. Reservatório de Itaparica



Fonte: Elaborada pela autora, 2016 (Base: Google Earth)

Tabela 1. Área cultivada e produção nos projetos de irrigação de Petrolândia-PE, 2004.

PRODUTOS	PROJETOS			TOTAL (ha)
	Apolônio salles (ha)	Barreiras (ha)	Icó-Mandantes (ha)	
Banana	125	15	10	150
Coco	300	80	137	517
Mamão	-	-	6	6
Manga	20	-	80	100
Goiaba	25	10	70	105
Melancia	30	10	200	240
Coentro	-	-	300	300
Abóbora	5	5	220	230
Cebola	-	-	28	28
Uva	16	-	16	32
Quiabo	4	-	20	24
Outros	50	50	85	185
TOTAL	575	170	1172	1917

Fonte: ATER/CODEVASF

2.2 ANÁLISE DE METAIS

Os nove metais contaminantes, Arsênio (AS), Cobre (Cu), Cádmio (Cd), Cromo (Cr), Chumbo (Pb), Ferro (Fe), Manganês (Mn), Zinco (Zn) e Mercúrio (Hg), foram quantificados na amostra de água dos pontos de coleta. A análise do íon mercúrio foi realizada no Instituto Tecnológico de Pernambuco (ITEP) de acordo com o método Absorção Atômica por Vapor Frio 3112B do Standart Methods Apha, (1998). As análises dos íons Ferro total, Manganês, Cádmio, Chumbo, Cobre, Cromo e Zinco foram feitas no Laboratório de Análises Minerais Solos e Água (LAMSA) no Departamento de Engenharia Química da UFPE, utilizando Espectrofotometria de Absorção Atômica (Aparelho CG AA 7000 BC), a metodologia usada foi Standard Methods for Examination of Water and Wastewater Apha, (1998).

As concentrações de metais mensuradas na água foram comparadas com valores de referência para água doce ("classe 2" de acordo com a legislação CONAMA Resolução 357/2005, CONAMA – 2005) e valores de referência para água de consumo humano de acordo com o ministério da saúde pela Portaria nº 2914/2011 do MS - 2011).

2.3 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

Os parâmetros físico-químicos Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$), Sólidos Dissolvidos (mg/L), O (mgO_2/L) /L), OD% (Salinidade (mg/L), Temperatura da água ($^{\circ}\text{C}$) e pH foram mensurados utilizando multiparâmetro.

2.4 DADOS PLUVIOMÉTRICOS

Os dados pluviométricos foram obtidos da Agência Pernambucana de Águas e clima (APAC -2016) e no Boletim de Monitoramento do reservatório do Rio São Francisco, Brasília, v11, setembro, 2016.

2.5 TESTE DO MICRONÚCLEO (MN)

Esfregaços de sangue periférico foram preparados a partir dos espécimes amostrados. As lâminas foram coradas com Giemsa (7,5%) durante cerca de seis minutos à temperatura ambiente. Os eritrócitos foram analisados em microscopia de imersão (100X). O número total de eritrócitos analisados foi padronizado em 1000 células para cada amostra.

2.6 ENSAIO COMETA (EC)

Para análises de ensaio cometa, amostras de sangue foram retiradas através da veia caudal, utilizando seringas heparinizadas. Uma amostra de 10 microlitros de cada espécime foi misturada com 120 microlitros de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%). A suspensão foi espalhada em lâminas previamente revestidas com agarose padrão (1,5%). Em seguida, as lâminas foram acondicionadas em porta-lâmina onde foi adicionada a solução de lise (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, 1% Triton x-100, 10% DMSO, pH 10), previamente refrigerada (4°C), e mantidas no escuro por uma hora em refrigerador. Após a lise celular, as lâminas foram colocadas na cuba de eletroforese, adicionando tampão (TBE – Tris Boro EDTA 1X). A eletroforese foi realizada nas seguintes condições: 25 V e 300 mA por 25 minutos. Terminado o procedimento, as lâminas foram fixadas em etanol absoluto e coradas com solução de Gel Red (1:100). Foram analisados 100 núcleos de cada espécime em microscópio de epifluorescência, utilizando um sistema de classificação visual baseado na migração de fragmentos de DNA, definidos em classes que variam de zero a quatro de acordo com o tamanho da cauda formada pelo DNA danificado. As análises dos dados foram realizadas utilizando dois parâmetros distintos, o índice de dano (ID), calculado como o total de produtos da multiplicação entre o número de cometas de cada classe e o dígito denominador da classe e a frequência do dano (FD), calculada como a porcentagem de todos os cometas em relação ao número total de células avaliadas.

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A homogeneidade dos dados foi verificada pelo teste de Bartlett, e, em seguida, os mesmos foram analisados usando os testes de variâncias (ANOVA e Kruskal Wallis) e o teste *a posteriori* de Tukey. O nível de significância adotado em todos os testes foi de 0,05.

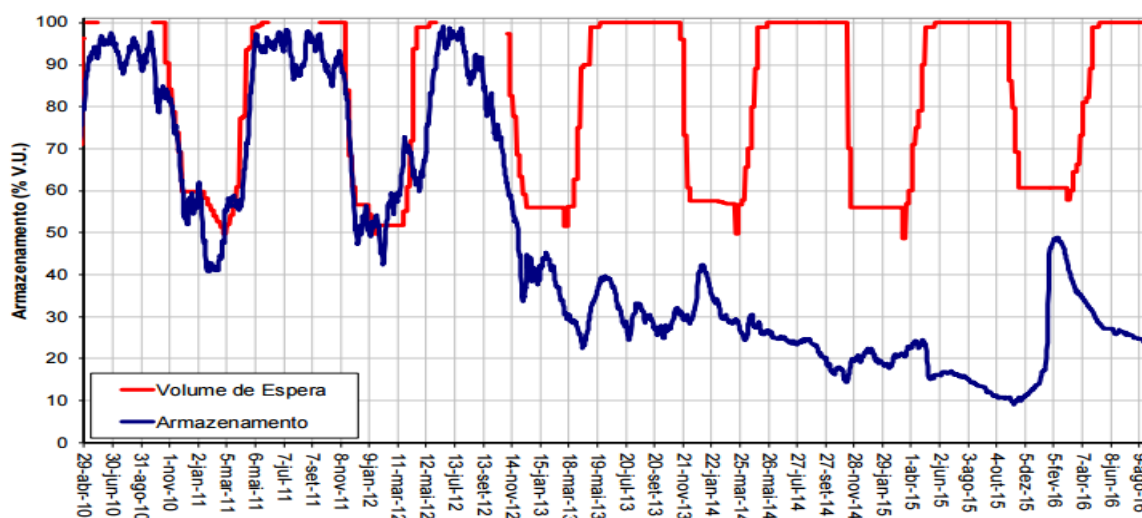
Todas as análises estatísticas de teste micronúcleo e ensaio cometa foram realizadas utilizando o software Statistica v. 6.0 (STATSOFT, INC.).

3 RESULTADOS

3.1 DADOS PLUVIOMÉTRICOS

Com base nos dados de acompanhamento dos níveis e das vazões afluentes do reservatório de Itaparica (ANA, 2010 ; ONS, 2016;), nos últimos dez anos, esse reservatório registrou variação de nível nos períodos seco e chuvoso (Figura 2). Nos anos de 2010 a 2012 foram observados níveis baixos críticos por curtos períodos, seguidos de recuperação. Contudo, a partir do final de 2012, devido ao evento da seca registrada na região, o sistema não apresentou os mesmos episódios de recuperação de nível registrados nos anos anteriores e esses episódios seguem até a presente data.

Figura 2. Variação de nível no reservatório de Itaparica de abril/2010 a agosto/2016



Fonte: Boletim de Monitoramento do reservatório do Rio São Francisco, setembro, 2016

3.2 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

Os parâmetros físico-químicos foram analisados na água de superfície e estão representados na tabela 2. A temperatura apresentou variação entre as estações com maior elevação durante o período de chuvas que, nesta região, equivale ao verão. Foi registrado

pH neutro na maioria dos pontos, enquanto que valores levemente alcalinos foram observados durante a estação chuvosa. Em todos os pontos amostrados a quantidade de oxigênio dissolvido está dentro da faixa da legislação

Tabela 2. Parâmetros físico-químicos das amostras de água coletadas durante as estações chuvosa e seca de 2015 e 2016, próximo aos Projetos de Irrigação no Lago de Itaparica, PE, Brasil

Locais de Coleta/Estação		Parâmetros Físico-Químicos			
		Temperatura (°C)	pH	OD (mgO ₂ /L)	OD%
BARREIRAS	CHUVOSO 2015	32	8.0	9.3	125
	SECO 2015	25	7.2	8.1	100
	CHUVOSO 2016	33	8.0	7.4	99
	SECO 2016	24	7.1	8.2	90
APOLÔNIO SALES	CHUVOSO 2015	34	8.0	8.5	99
	SECO 2015	23	6.4	7.5	87
	CHUVOSO 2016	32	8.2	8.9	100
	SECO 2016	22	7.5	7.8	90
ICÓ MANDANTES	CHUVOSO 2015	32	8.1	8.2	99
	SECO 2015	23	7.2	7.4	88
	CHUVOSO 2016	31	8.2	8.0	100
	SECO 2016	25	7.4	8.0	89
CONAMA nº357/2005 VMP*		ND	6,0 a 9,0	≥5	ND

*VMP (mg/L) = valor máximo permitido (Resolução CONAMA 357/2005, estabelecido para águas doce classe 2). ND = Não Definido

3.2 ANÁLISES DE METAIS

Os valores obtidos para as concentrações de metais estão dispostos na tabela 3.

Tabela 3. Concentração de Metais em projetos de irrigação no Lago de Itaparica durante as estações chuvosa e seca dos anos de 2015 e 2016

Estações/Locais de coleta	Concentração de metais (mM)								
	AS	Cd	Cr	Cu	Hg	Mn	Pb	Zn	Fe
Resolução Conama nº357/2005 (VMP*)	0,02	1,77	9,61	15,73	0,001	18,20	2,41	3,05	5,37
Chuvoso 2015									
Apolônio Sales	< 0,13	ND**	ND	ND	< 0,01	ND	ND	ND	ND
Barreiras	< 0,13	ND	ND	ND	< 0,01	ND	ND	ND	ND
Icó Mandantes	< 0,13	ND	ND	ND	< 0,01	ND	ND	ND	2,53
Seco 2015	< 0,13								
Apolônio Sales	< 0,13	ND	ND	ND	< 0,01	ND	ND	0,66	ND
Barreiras	< 0,13	ND	ND	ND	< 0,01	ND	ND	0,66	1,60
Icó Mandantes	< 0,13	ND	ND	ND	< 0,01	ND	0,133	0,66	ND
Chuvoso 2016	< 0,13								
Apolônio Sales	< 0,13	ND	ND	ND	< 0,01	1,33	ND	0,66	ND
Barreiras	< 0,13	ND	ND	ND	< 0,01	1,33	ND	0,40	0,80
Icó Mandantes	< 0,13	ND	ND	ND	< 0,01	0,66	ND	0,93	ND
Seco 2016	< 0,13								
Apolônio Sales	< 0,13	ND	ND	ND	< 0,01	ND	ND	ND	3,60
Barreiras	< 0,13	ND	ND	ND	< 0,01	ND	ND	ND	ND
Icó Mandantes	< 0,13	ND	ND	ND	< 0,01	1,20	ND	0,93	ND

*Valor Máximo Permitido

**Não Definido

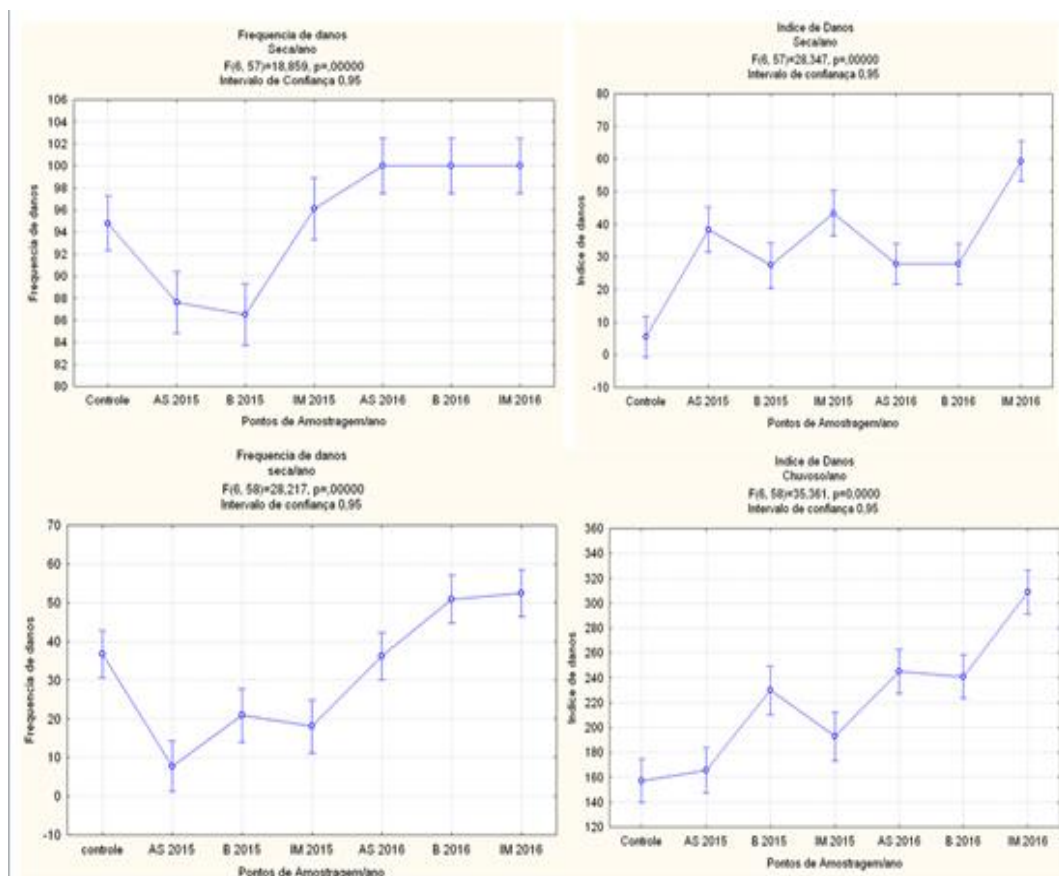
3.4 TESTE DO MICRONÚCLEO (MN) E ENSAIO COMETA (EC)

No ano de 2015, no período chuvoso o ensaio cometa apresentou diferenças significativas entre os locais de coleta e o controle. O maior índice de dano ocorreu no B (229,88 $\pm$ 87,62) diferindo do AS ($p=0,0001$) e do IM ($p=0,01$). No período seco, o maior dano foi no IM (16,125) e houve diferença para o B ($p=0,02$).

No ano de 2016, no período chuvoso, o índice de dano entre o controle e os demais pontos amostrados foi bastante significativo ($p < 0,0001$). A diferença entre os pontos foi significativa apenas entre o IM e os demais. AS e B não apresentaram diferenças. A figura 1 mostra o índice e a frequência de danos que ocorreram durante as estações, chuvosa e seca, em cada ponto de coleta, no ano de 2015 e 2016.

Os danos no DNA foram mais frequentes em 2016 com maior significância para o IM e B. No período chuvoso, a frequência de danos entre os pontos foi a mesma, diferindo apenas do controle ($p < 0,0004$). Já no período seco deste mesmo ano, o IM apresentou-se com danos mais frequentes que os demais pontos analisados ($p < 0,0001$). O IM foi o ponto que apresentou o maior índice de dano no decorrer dos anos estudados, como maior índice de danificação em 2016 ($p < 0,0001$).

Figura 3. Frequência e índice de dano no período seco 2015/2016 e no período chuvoso 2015/2016.



A comparação dos resultados àqueles do lago Paranoá, apresentou maior índice de proporcionalidade das médias de micronúcleos e índice de danos obtidos nos pontos de amostragem durante as diferentes estações, em relação à média dos mesmos parâmetros obtidos em *Cichla temensis*. Apenas o projeto Barreiras, no período seco de 2015, apresentou média de MN em favor do lago Paranoá. As médias de MN e os ID estão representados na tabela 3.

Os valores da comparação entre as médias de MN e ID de *Cichla ocellaris* e *Cichla temensis* através da análise do qui-quadrado estão representados na tabela 4. Os resultados que não apresentaram significância estão destacados na tabela. O ID do Lago de Itaparica foi estatisticamente diferente do Lago Paranoá em todas as estações durante os anos estudados.

Tabela 5. Valores de significância pela análise do Qui-Quadrado entre as médias de micronúcleos (MN) e índice de danos (ID) obtidos nos pontos de amostragem durante as diferentes estações, em relação à média dos mesmos parâmetros obtidos em *Cichla temensis* no Lago Paranoá (DF)

Locais de Amostragem	Anos/ Parâmetros							
	2015				2016			
	MN		ID		MN		ID	
	Chuvoso	Seco	Chuvoso	Seco	Chuvoso	Seco	Chuvoso	Seco
Apolônio Sales	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p > 0,1$	$P < 0,02$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
Barreiras	$p > 0,95$	$p < 0,05$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p > 0,3$	$p > 0,1$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
Mandantes	$p > 0,05$	$p < 0,01$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p > 0,1$	$P < 0,01$	$p < 0,001$	$p < 0,001$

Nível de significância 0,05.

4 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho apresentaram forte relação com as características da ocupação e das atividades não-sustentáveis desenvolvidas em cada projeto de irrigação, que são marcados por várias irregularidades desde suas origens, quando foi construída a Usina Hidrelétrica Luís Gonzaga, em 1988. Devido à inexistência de um local livre de poluentes na região, o ambiente em estudo foi comparado com o Lago Paranoá-DF (tabelas 3 e 4) cujo biomonitoramento utilizou o gênero *Cichla* (espécie *C. temensis*) (Grisolia et al., 2009). O lago de Itaparica apresentou maior índice de proporcionalidade das médias de micronúcleos e

índice de danos obtidos nos pontos de amostragem durante as diferentes estações, em relação à média dos mesmos parâmetros obtidos em *Cichla temensis* no Lago Paranoá, com destaque para o IM (MN= 3,086; ID= 2,954 durante a estação seca), sugerindo um maior grau de impacto no lago de Itaparica.

O IM é o maior perímetro irrigado e utiliza a maior quantidade de pesticidas. Toda água da irrigação é drenada de volta para o Lago. Existe uma lixiviação natural através das chuvas e da Baía Icó-Mandantes que desemboca no Lago, e uma lixiviação artificial através dos drenos existentes, que também possuem o mesmo destino.

No perímetro Irrigado de Icó-Mandantes, onde o solo é predominantemente arenoso e o sistema de irrigação adotado inicialmente foi aspersão convencional, o volume médio anual de água aplicada nos lotes é de 34.600m³/ha/ano. (Shopert, 2014), valor muito superior ao consumo registrado em AS. O projeto AS é o segundo maior em irrigação, porém a sua localização permite receber água proveniente do projeto Icó-Mandantes que apresenta maior área cultivada.

Além disso, próximo à descarga desses projetos, é praticada a piscicultura em tanque-rede, fato que contribui para a eutrofização do Lago. De acordo com estudos anteriores (Melo et al, 2007; Sobral et al, 2015; Nailza et al, 2016), o múltiplo uso deste reservatório vem trazendo sérios problemas ambientais e comprometendo a qualidade da água como, por exemplo, o aumento da quantidade de fósforo e subsequente eutrofização e floração de algas.

Tais características inerentes a cada ponto de amostragem contribuem para a análise e ratificação dos resultados obtidos, como discutido abaixo.

Na estação chuvosa de 2015/2016 não houve diferença significativa para MN entre os pontos (exceto AS vs B em 2015). Porém, quando comparada à estação seca, houve um aumento significativo para o projeto AS e IM. Para Silva et al. (2014), os peixes expostos a pesticidas usados em lavouras de cana-de-açúcar podem sofrer um alto nível de danos citotóxicos e mutagênico representado pelo aumento de células micronucleadas. Este fato pode ser observado devido ao escoamento de poluentes através da água da chuva. Fato que torna o dano sem significância entre os pontos, uma vez que todos eles são afetados por esse carreamento, diferentemente quando comparado ao período de seca.

No presente estudo, mesmo durante a estação seca, pode ter ocorrido o carreamento de misturas complexas de pesticidas que são utilizados nas lavouras presentes nos pontos de coleta, embora existam diferenças em relação à drenagem que é peculiar em cada projeto estudado. Outro fato importante é que os três projetos se comunicam e o escoamento é dado

no sentido IM-AS-B, sendo os múltiplos usos da água e do solo crescentes no sentido inverso. O projeto Barreiras apesar de apresentar menor perímetro irrigado e drenagem artificial, recebe água de todos os demais projetos e conta com a drenagem natural do Riacho Barreiras, mesmo sendo temporário. Este fato justifica os valores elevados de índice e frequência de dano neste ponto de coleta, durante as estações chuvosas de ambos os anos. Além disso, os resultados encontrados para MN nesta mesma localidade sugerem uma concentração de substâncias clastogênicas e/ou aneugênicas durante a estação seca, pois é nesta estação que a quantidade de MN se eleva.

Estes resultados estão de acordo com Susuk et al. (2000) que encontraram uma frequência maior de MN na estação seca, em apenas um ponto específico na extremidade do rio. Devido às implicações ecológicas associadas à genotoxicidade, a detecção e a quantificação de danos genéticos são de interesse em estudos ambientais. Alguns tipos de contaminantes encontrados em ambientes aquáticos aumentam significativamente o número de micronúcleos e alterações morfológicas nucleares, quando os peixes são expostos a compostos como PCBs, PAHs e pesticidas (Hose et al. 1987).

No presente trabalho, os resultados revelam valores mais acentuados de dano durante o período de chuva, principalmente no ano de 2016, quando o Lago apresentou um nível mais elevado. Além da acentuada quantidade de água que é usada na irrigação e chega ao Lago através da drenagem, o aumento das chuvas em 2016 pode ter carreado maior quantidade de contaminantes, inclusive pesticidas. A presença de numerosos pesticidas com variadas concentrações em fluxos de drenagem agrícolas (tanto superficiais como subterrâneas) tem sido relatada com frequência em estudos científicos e programas de monitoramento (Mahboob et al. 2015; Yadav et al. 2015; Sharma et al. 2015).

Christofoletti (2008), trabalhando com *Oreochromis niloticus* em uma lagoa urbana, observou a intensificação dos danos durante períodos de chuva, quando a lagoa apresentava nível de água elevado, corroborando os resultados encontrados no presente estudo. Já os estudos realizados por Da Silva-Souza e Fontanetti (2006), no rio Paraíba do Sul, também com *O. niloticus*, apresentaram maiores índices de alterações em período de reduzido nível de água, indicando influência da sazonalidade e precipitação. Por outro lado, Ergene et al. (2007) descrevem que as concentrações dos poluentes nas águas dependem dos fenômenos de enriquecimento e diluição, causados pela chuva ou pela drenagem da água. A alta precipitação pode agravar os efeitos da poluição pela maior lixiviação dos poluentes provenientes do solo ou da rede de esgotos podendo ainda causar escoamento superficial, que é reconhecido como

uma das principais fontes de poluentes para as águas superficiais (Kayhanian et al., 2007). E, segundo Esteves (1998), em lagos muito rasos, a precipitação ocasiona uma maior interação dos elementos presentes no sedimento com a coluna d'água.

Bresler et al., (2001) encontraram diferenças sazonais na frequência de MN sobre *Tilapia zilli* e *Cyprinus carpio* nas amostras de água do Rio Yarkon (Israel) coletadas durante a estação chuvosa. O aumento na frequência de MN foi induzido pelo escoamento superficial de lodo, resíduos sólidos urbanos e produtos químicos presentes no solo que continham compostos genotóxicos e clastogênicos. Portanto, o escoamento superficial de áreas agrícolas através dos drenos e dos riachos, com a expressão de efeitos sazonais, podem ter contribuído para o aumento de MN observado no presente estudo.

Os resultados do presente estudo retratam bem essa dinâmica de carreamento de poluentes, de acordo com as estações, e evidenciam a importância das implicações sócio-econômicas de uso da terra, em cada ponto amostrado, que respondem ao aumento ou diminuição do volume de água no reservatório de Itaparica, em interação com as características de cada ponto de coleta. Os parâmetros de danificação genômica encontrados em todos os pontos refletiram essa dinâmica pela quantificação diferencial observada em ambas as estações e anos consecutivos.

O reservatório de Itaparica apresentou variação nos parâmetros físico-químicos durante as estações. A temperatura elevada durante a estação chuvosa, aliada ao aporte de nutrientes que o lago recebe por diferentes carreadores, favorece a eutrofização deste ambiente e, conseqüentemente, a floração de cianobactérias que é comum nos reservatórios do Estado de Pernambuco. As cianobactérias dos gêneros *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Oscillatoria* e *Cylindrospermum* produzem neurotoxinas (anatoxina-a) que apresentam estrutura semelhante aos agrotóxicos da classe dos organofosforados e, assim como esses compostos, é capaz desencadear estresse oxidativo entre seus efeitos secundários (Carmichael et al., 1989; Rapala, 1994; Wood et al., 2007).

Sobral et al. (2015) ao estudar a clorofila *a* no reservatório de Itaparica, observaram que após o contato de riachos com o reservatório ocorria aumento na concentração da clorofila *a*, podendo esta estar associada a entrada de nutrientes. Este evento foi observado nos contatos dos Riachos Mandantes e Barreiras.

Antonello et al. (2010) avaliou a correlação entre as características limnológicas do reservatório de Itaparica, com o uso de sensoriamento remoto, por meio de informações digitais extraídas de imagens orbitais de alta resolução, e obteve respostas relacionadas a

observações pontuais, como valores indicadores de eutrofização, nas proximidades de Petrolândia. Esta região, segundo os pesquisadores, apresenta maiores fontes de efluentes ricos em fósforo para o reservatório, decorrente da descarga de resíduos humanos e do carreamento de compostos oriundos da fertilização nos perímetros irrigados próximos desta localidade. Estes fatos também podem ter contribuído para os diferentes graus de danos genômicos observados em todos os pontos de amostragem deste estudo.

A partir do ensaio do cometa, constatou-se grande perda de integridade do DNA pela observação de cometas de classes 1, 2, 3 e 4, resultando em elevados IDs, sugerindo um elevado potencial genotóxico das amostras avaliadas, sobretudo no IM que apresentou diferença significativa em índice e frequência de danos. Segundo Kamman et al. (2001), eventos que são constatados pelo ensaio do cometa são considerados lesões potencialmente pré-mutagênicas. Tais lesões, se persistentes, podem comprometer a sobrevivência e permanência das espécies residentes. Esses danos no DNA foram mais intensos durante a estação chuvosa de 2016, quando ocorreu maior pluviosidade, em relação a 2015.

Os danos genotóxicos observados nos eritrócitos dos peixes utilizados neste estudo podem estar diretamente relacionados com os diferentes componentes das águas superficiais do Lago de Itaparica, como metais, pesticidas e outros componentes inorgânicos e orgânicos desta mistura complexa. Apesar da análise de metais apresentar valores dentro da legislação vigente, Atli e Canli (2008) relatam que mesmo em baixas concentrações, eles são capazes de perturbar a integridade dos mecanismos fisiológicos e bioquímicos dos peixes. Os danos em nível de DNA representados pela formação de micronúcleos e também pela presença de pequenas lesões detectadas pelo ensaio cometa em peixes que foram expostos a pequenas concentrações de metais são indicativos da acumulação de agentes potencialmente genotóxicos (Kligerman, 1982). Fato semelhante é observado em nosso estudo sugerindo um efeito bioacumulador tendo em vista que *C. ocellaris* é um organismo ocupante do topo de uma cadeia alimentar. Os resultados obtidos ainda reforçam a importância da análise genotóxica como ferramenta de biomonitoramento de ambientes aquáticos pelo seu poder de detecção de efeitos subletais em concentrações muito baixas de poluentes e contaminantes.

5 CONCLUSÃO

O Teste do Micronúcleo demonstrou que houve efeito mutagênico significativo sobre os eritrócitos de *Cichla ocellaris*, capturados nos três projetos de irrigação no Lago de Itaparica. O Ensaio do Cometa foi eficiente para detectar efeitos genotóxicos para todos os tempos e locais amostrados. Os resultados apontam para o uso insustentável e má gestão dos

bens de consumo neste local, fato que produz significativa vulnerabilidade à saúde de toda comunidade, uma vez que o organismo em questão tem grande importância na alimentação da população local.

A degradação ambiental do Lago de Itaparica e as drenagens existentes nos projetos de irrigação lá inseridos podem resultar em uma relação causa/efeito, como demonstrado pelos danos no DNA observados na espécie estudada. O presente estudo revelou a presença de efeitos genotóxicos mais intensos no Projeto Icó Mandantes, o qual recebe água do Riacho Mandantes que constitui ponto de construção do Eixo Leste, uma das obras do Projeto de Integração do rio São Francisco. Este será utilizado para levar água por cerca de 220 km até o rio Paraíba, na Paraíba. Portanto, o projeto Icó-Mandantes pode ser um dispersor de poluentes, para as demais regiões, sugerindo um risco ambiental para esta e outras espécies que estarão integradas à água oriunda desta localidade. Neste estudo, nós mostramos que *Cichla ocellaris* é um bom organismo modelo para monitorização in situ, com a avaliação dos níveis de genotoxicidade e contaminação ambiental podendo ser útil em futuros trabalhos de biomonitoramento de outros reservatórios.

REFERÊNCIAS

ADAM, M. L., TORRES, R. A., SPONCHIADO, G., MOTTA, T. S., OLIVEIRA, C. M. R., CARVALHO-FILHO, M. A., & CORREIA, M. T. S. (2010). Environmental degradation at a public park in Southern Brazil as revealed through a genotoxicity test (MN) on peripheral blood cells from *Poecilia vivipara* (Teleostei). *Water, Air, and Soil Pollution*, 211, 61–68

AGENCIA NACIONAL DE AGUAS. Conjuntura dos recursos hídricos no Brasil: informe 2010. Ed. Especial. Brasília: ANA, 2010

AGÊNCIA PERNAMBUCANA DE ÁGUAS E CLIMA. Bacias hidrográficas - grupo de bacias de pequenos rios interiores 3 - GI3. Recife: APAC, 2013. Disponível em: <<http://www.apac.pe.gov.br/pagina.php>>. Acesso em: 12 de out 2015

AGÊNCIA PERNAMBUCANA DE ÁGUAS E CLIMA. Bacias hidrográficas - grupo de bacias de pequenos rios interiores 3 - GI3. Recife: APAC, 2013. Disponível em: <<http://www.apac.pe.gov.br/pagina.php>>. Acesso em: 12 de jan 2014

APAC – AGÊNCIA PERNAMBUCANA DE ÁGUAS E CLIMA, 2016. Disponível em: <http://www.apac.pe.gov.br/>. Acesso em: 12 de agosto de 2016

ARALDI, P.P; MELO, T.C; MENDES, T.B; JÚNIOR, P.L.S; NOZIMA, B.H.N.N; ITO, E.T; CARVALHO, R.F; SOUZA, E.D; STOCCO, R.C. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v.72, p. 74–82, 2015.

ARALDI, R.P.; et al. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: a review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. v. 72, p. 74-82, 2015

ARRUDA, N. O. Controle do aporte de fósforo no reservatório de Itaparica localizado no semiárido nordestino , 2015. 186folhas, Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação Engenharia Civil, 2015.

ATLI, G.; CANLI, M. Responses of metallothionein and reduced glutathione in a freshwater fish *Oreochromis niloticus* following metal exposures. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 25: 33-38, 2008.

BARBOSA, J.S., CABRAL T.M., FERREIRA, D.N., AGNEZ-LIMA, L.F. & BATISTUZZO DE MEDEIROS, S.R. 2010. Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73: 320-325

BRASIL. Conselho Nacional de Meio Ambiente. Resolução nº 359/2005. Dispõe sobre a regulamentação valores de referência para água de consumo humano de acordo com o ministério da saúde pela Portaria nº 2914/2011 do MS - 2011

BRESLER, V. M., Fishelson, L., Abelson A. 2001. Determination of primary and secondary responses to environmental stressors and biota health, In: I. Linkov, J. Palma-Oliveira (Eds.), *Assessment and Management of Environmental Risks*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, p. 57–70

BUSCHINI A, MARTINO A, GUSTAVINO B, MONFRINOTTI M, POLI P, ROSSI C, SANTORO A, DORR AM AND RIZZONI M (2004). Comet assay and micronucleus test in circulating erythrocytes of *Cyprinus carpio* specimens exposed in situ to lake waters treated with disinfectants for potabilization. *Mutat Res* 557:119-129

ÇAVAS, T. & KÖNEN, S. 2008. In vivo genotoxicity testing of the amnesic shellfish poison (domoic acid) in piscine erythrocytes using the micronucleus test and the comet assay. *Aquatic Toxicology*, 90: 154-159.

CESTARI, M.M., LEMOS, P.M.M., RIBEIRO, C.A.O., COSTA, J.R.M.A., PELLETIER, E., FERRARO, M.V.M., MANTOVANI, M.S. & FENOCCIO, A.S. 2004. Genetic damage induce by trophic doses os lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by comet assay and cromosomal aberrations. *Genetics and Molecular Biology*, 27: 270-274.

CHESF - Companhia Hidro Elétrica do São Francisco (2004). Programa de Monitoramento Limnológico e Avaliação da Qualidade da Água do Reservatório de Itaparica. Recife: PETCON.

CHESF. Companhia Hidrelétrica do São Francisco. Projeto de Irrigação IcóMandantes. Plantas do arranjo do sistema de drenagem dos Blocos 3 e Bloco-4: CHESF, 2011.

CHRISTOFOLETTI, C.A. 2008. Avaliação dos potenciais citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas de um ambiente lântico, por meio dos sistemas-teste de *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus*. 129 f. Dissertação (Dissertação de mestrado em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular) Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Instituto de Biociências - Rio Claro, São Paulo. 2008

CODEVASF - Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e do Parnaíba. Apolônio Sales: Produção Agrícola/Características da produção. Disponível em: . Acesso em: 24/04/2015.

CODEVASF - Companhia De Desenvolvimento Dos Vales Do São Francisco E Do Parnaíba. Disponível em: Acesso em: 23/09/2014.

CODEVASF - Companhia De Desenvolvimento Dos Vales Do São Francisco E Do Parnaíba. Apolônio Sales: Produção Agrícola/Características da produção. Disponível em: <<http://www.codevasf.gov.br/principal/perimetros-irrigados/elenco-deprojetos/apolonio-sales>>. Acesso em: 24/04/2017.

CODEVASF - Companhia De Desenvolvimento Dos Vales Do São Francisco E Do Parnaíba. Disponível em: <http://www.codevasf.gov.br/programas_acoes/desenvolvimento-territorial/arranjos_produtivos-locais/arranjo-produtivo-de-aqueicultura-do-lago-de-itaparica> Acesso em: 23/09/2011.

COMPANHIA HIDRELÉTRICA DO SÃO FRANCISCO. Projeto de Irrigação IcóMandantes: Plantas do arranjo do sistema de drenagem dos Blocos 3 e Bloco-4. Petrolândia: Convênio CHESF-CODEVASF, 2011.

CONDEPE/FIDEM – Agência Estadual de Planejamento e Pesquisas de Pernambuco. Diagnóstico sócio, econômico, político e cultural de PetrolândiaPE, 2001.

CONDEPE/FIDEM – Agência Estadual de Planejamento e Pesquisas de Pernambuco. Diagnóstico sócio, econômico, político e cultural de PetrolândiaPE, 2001.

CONDEPE/FIDEM, 2001. Diagnóstico sócio, econômico, político e cultural de Petrolândia-PE.

COOPER, R. L. et al. Neuroendocrine and reproductive effects of contemporary-use pesticides. *Toxicology and Industrial Health*, v. 15, n. 1/2, p. 26-36, 1999.

DA SILVA SOUZA, T. & FONTANETTI, C.S. 2006. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. *Mutation Research*, 605: 87-93.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Diagnóstico agroambiental do município de Petrolândia no Estado de Pernambuco: Circular Técnica nº 29. Rio de Janeiro: EMBRAPA, 2004.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Manual de Boas Práticas Agrícolas e Sistema APPCC. Brasília: EMBRAPA/SEDE, 101 p., 2004.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Recursos hídricos no Brasil e no mundo. Documento nº33. Planaltina. EMBRAPA, 2001.

ERGENE, S., ÇAVAS, T. ÇELİK, A. KÖLEİL, N., AYMAK, C. Evaluation of river water genotoxicity using the piscine micronucleus test. 2007. *Environ. Mol. Mutagen.* 48, 421-429

ESTEVEZ, F. A. Fundamentos de Limnologia. 2. Ed. Rio de Janeiro: Interciência, 1998.

FONTAÍNHAS-FERNANDES, A. 2005. The use of Biomarkers in Aquatic Toxicology Studies. *Revista Portuguesa de Zootecnia*, 12: 67- 86

FONTENELE, O., 1948, Um caráter sexual secundário extragenital nos tucunarés (*Actinopterygii*, *Cichlidae*). *Rev. Brasil. Biol.*, 8: 185-188.

GHISI, N.C; OLIVEIRA, E.C.; FÁVARO, L.F; ASSIS, H.C.S; PRIOLI, A.J. In Situ Assessment of a Neotropical Fish to Evaluate Pollution in a River Receiving Agricultural and Urban Wastewater. *Bull Environ Contam Toxicol* 93:699–709; 2014

KAYHANIAN M, SUVERKROPP C, RUBY A AND TSAY K. 2007. Characterization and prediction of highway runoff constituent event mean concentration. *J. Environ. Manag.* 85, 279-295.

KLIGERMAN A. D. Fishes as biological detectors of the effects genotoxic agents. In: HEDDLE J. A. (ed). *Mutagenicity: New Horizons in Genetic Toxicology*, Academic Press, p.435-456, 1982.

KLOBUCAR, G., PAVLICA, M., ERBEN, R. & PAPES, D. 2003. Application of the micronucleus and comet assays to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments. *Aquatic Toxicology*, 64: 15-23.

MAHBOOB, S., NIAZI, F., ALGHANIM, K., SULTANA, S., AL-MISNED, F., AHMED, Z., 2015. Health risks associated with pesticide residues in water, sediments and the muscle tissues of *Catla catla* at Head Balloki on the River Ravi. *Environ. Monit*

MELO, G. L. de.; 2006. Estudo da qualidade da água no reservatório de Itaparica localizado na bacia do rio São Francisco. Recife,. Dissertação de mestrado – Universidade Federal de Pernambuco. Programa de Pós Graduação em Engenharia Civil. p. 15-16.

MONTEIRO, D., RANTIN, F., KALININ, A., 2009. The effects of selenium on oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish matrinxa, *Brycon cephalus* (Günther,1869) exposed to organophosphate insecticide Folisuper 600 BR® (methyl parathion). *Comp. Biochem. Physiol. C* 149, 40e49.

NWANI, C.D., LAKRA, W.S., NAGPURE, N.S., KUMAR, R., KUSHWAHA, B. & SRIVASTAVA, S.K. 2010. Mutagenic and genotoxic effects of carbosulfan in freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 202-208

OMAR, W. A., ZAGHLOUL, K. H., ABDEL-KHALEK, A. A., ABOHEGAB, S. Genotoxic effects of metal in two fish species, *Oreochromis niloticus* and *Mugil cephalus*, from highly degraded aquatic habitats. *Mutat. Res.* 746, 7-14, 2012.

OPERADOR NACIONAL DO SISTEMA ELÉTRICO. Volume dos principais reservatórios: Luiz Gonzaga. Disponível em: <http://www.ons.org.br/historico/percentual_volume_util_out.aspx>. Acesso em: 15 Jan. ONS, 2016.

OSMAN, A., KOUTB, M., SAYED, A., 2010. Use of hematological parameters to assess the efficiency of quince (*Cydonia oblonga miller*) leaf extract in alleviation oh the effect of ultravioleta- A radiation on African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *J. Photochem. Photobiol. B* 99, 1-8.

RIVEIRO, C.L.G. Perfil da Frequencia de Micronúcleos e de Danos no DNA de Diferentes Espécies de Peixes do Lago Paranoá, Brasília-DF, Brasil. 2007.143f. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular). Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular. Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília. Brasília-DF, 2007

ROCHA, P.S., LUVIZOTTO, J.L., KOSMEHL, T., BÖTTCHER, M., STORCH, V., BRAUNBECK, T. & HOLLERT, H. 2009. Sediment genotoxicity in the Tietê River (São Paulo, Brazil): In vitro comet assay versus in situ micronucleus assay studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72: 1842-1848.

SCHÖPERT, M.L. Influences on the nutrient level in agricultural drainage water in the semiarid area Icó-Mandantes in Pernambuco, Brazil. Technische Universität Berlin and Universidade Federal de Pernambuco. 2014.

SHARMA, R., PESHIN, R., SHANKAR, U., KAUL, V., SHARMA, S., 2015. Impact evaluation indicators of an integrated pest management program in vegetable crops in the subtropical region of Jammu and Kashmir, India. *Crop Prot.* 67, 191e199.

SOBRAL, M. C. M.; CARVALHO, R. M. C. M. de O. Gerenciamento de riscos ambientais em reservatórios de múltiplos usos localizados na região semi-árida. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE GESTÃO DE RESERVATÓRIOS E BACIAS HIDROGRÁFICAS, 10, 2006, Recife. Anais... Recife: UFPE, TU Berlin, 2006

SOBRAL, M. C.; CARVALHO, R. M. C. M. de O.; SILVA, M. M.; MELO, G. L. Uso e ocupação do solo no entorno de reservatórios no semiárido brasileiro como fator determinante da qualidade da água. In: CONGRESSO INTERAMERICANO DE INGENIERÍA SANITARIA Y AMBIENTAL, 30, 2006, Punta del Leste, Anais... Punta del Leste: AIDIS, 2006.

SOUZA, T. S. & FONTANETTI, C.S. 2006. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. *Mutation Research.*, 605: 87-93

VALVERDE, M. & ROJAS, E. 2009. Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 681: 93-109

YONAR, S., URAL, M., SILICI, S., YONAR, M., 2014. Malathion-induced changes in the haematological profile, the immune response, and the oxidative/antioxidante status of *Cyprinus carpio carpio*: protective role of propolis. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 102, 202e209.

KAMMAN, U., BUNKE, M. & STEINHART, H. 2001. A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay. *Mutation Research*, 498: 61-77.

3.2 MARCADORES BIOQUÍMICOS DE *CICHLA OCELLARIS* NO MONITORAMENTO AMBIENTAL

Kaline Catiely Campos Silva¹, Caio Rodrigo Dias Assis¹, Ricielly, Marlyete Chagas de Araújo¹, Kelma Sirleide de Souza¹, Mônica Lúcia Adam², Ranilson de Souza Bezerra¹

¹Laboratório de Enzimologia (LABENZ), Departamento de Bioquímica Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420, Recife-PE, Brazil

²Centro Acadêmico de Vitória (CAV), Universidade Federal de Pernambuco, R. Alto do Reservatório, s/n - Bela Vista, 55608-680, Vitória de Santo Antão-PE, Brazil

Corresponding author:

Ranilson S. Bezerra

Laboratório de Enzimologia (LABENZ), Departamento de Bioquímica e Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420, Recife-PE, Brazil.

Tel, +55 81 21268540; Fax, +55 81 21268576

email: ransoube@uol.com.br

RESUMO

Estudos de misturas complexas de contaminantes tem atraído atenção devido ao fato de que elas podem exibir alta toxicidade e causar danos a longo prazo para o meio ambiente e as vidas humanas, mesmo em baixas concentrações. A análise de biomarcadores bioquímicos constitui uma ferramenta eficiente nos estudos de avaliação de risco e impacto ambiental, pois conseguem realizar a detecção precoce dos efeitos nos organismos em virtude da exposição aos poluentes ambientais. O Brasil está entre os maiores consumidores de agrotóxicos do mundo e nesse contexto destacam-se os compostos organofosforados (OP) e carbamatos (CA). O presente trabalho teve como objetivo avaliar marcadores bioquímicos de exposição (SOD, CAT e LPO) e efeito (AChE e BChE) obtidos dos tecidos de *Cichla ocellaris* coletados próximos a projetos de irrigação, Apolônio Sales (AS), Barreiras (B) e Icó-Mandantes (IM), no Lago de Itaparica, durante as estações chuvosa e seca de 2015 e 2016. Foi avaliada a concentração de metais traços (Cr, Cd, Cu, Mn, As, Fe, Zn, Pb e Hg) e todos apresentaram-se dentro dos valores de referência. Foram analisados parâmetros físico químicos como temperatura, OD e pH. As temperaturas mais elevadas foram registradas no período chuvoso. O ponto de coleta AS e o ponto IM apresentaram valores invertidos para os marcadores CAT, SOD e AChE, estimados no ano de 2015. O aumento do volume do reservatório durante o ano de 2016 provocou mudanças nas atividades de todos os marcadores

utilizados. Estes marcadores mostraram diferenças significativas ao longo dos anos e das estações, bem como dos pontos amostrados, sugerindo uma influência não apenas das estações como também da dinâmica ecológica de cada projeto de irrigação que apresentam peculiaridades quanto ao uso do solo e múltiplos usos da água.

Palavras-chaves: Colinesterases, biomonitoramento, estresse oxidativo

1 INTRODUÇÃO

O ambiente aquático é considerado como um dos receptáculos finais de poluentes químicos, tanto de origem agrícola como urbana. Dessa forma, esse ambiente está exposto a processos de poluição causados pela grande variedade e quantidade de substâncias químicas (Livingstone, 1993). O Brasil possui aproximadamente 18% do potencial hídrico superficial utilizável do planeta (Setti, 1998) e, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, em 2010, foi o maior consumidor de defensivos agrícolas do mundo (ANVISA, 2010). Consequentemente, os efeitos adversos da interação poluente químico - biota é sentido nos diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar ao ser absorvidos pelos organismos onde sofrerão bioacumulação ou detoxificação (Nimmo, 1985).

Os riscos causados por pesticidas tem atraído grande atenção devido ao fato de que eles exibem uma toxicidade aguda elevada e podem afetar organismos não-alvo em ecossistemas naturais causando danos à saúde ambiental; aos organismos aquáticos, como os peixes, e as vidas humanas, mesmo em baixas concentrações. Contudo, algumas cidades que se encontram longe dos grandes centros possuem limitações para determinação da presença de pesticidas no ambiente e em organismos aquáticos, como o tempo de transporte da amostra, alto valor da instrumentação e de pessoal altamente qualificado; exigido pelos métodos analíticos tradicionais como a cromatografia em fase gasosa, cromatografia líquida de alta eficiência, eletroforese capilar e espectrometria de massa que são utilizados com eficiência para analisar amostras contaminadas por pesticidas (Songa e Jonathan, 2016).

O Estado de Pernambuco, por exemplo, não conta com laboratórios que realizem uma bateria suficiente de análises de compostos como os organofosforados e carbamatos, que causam grande risco as populações, e as amostras devem ser encaminhadas para o sul, sudeste ou até mesmo para fora do país, o que tornaria inviável uma análise de compostos mais voláteis.

Sistemas de avaliação de risco de agrotóxicos têm sido implementados e/ou aperfeiçoados constantemente em diversas partes do globo. Em 2015 o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) montou um Grupo Técnico

focado no desenvolvimento de novas ferramentas para avaliação de risco ambiental de agrotóxicos a organismos aquáticos.

Quando presente no ambiente aquático, os xenobióticos podem causar distúrbios que desencadeiam, inicialmente, perturbações de reações bioquímicas em um determinado organismo (Peters, 2013). Se estas alterações bioquímicas forem observadas com uma certa antecedência, pode ser possível a identificação de problemas ambientais antes que o ecossistema aquático, como um todo, seja afetado (Adam et al., 2010). Por essa razão, os biomarcadores ao nível bioquímico apresentam-se como sistemas de alerta no diagnóstico da saúde ambiental (Assis et al., 2010). Além disso, podem responder de forma específica a um determinado poluente com alta sensibilidade, rapidez e baixo custo.

Dentre os biomarcadores utilizados neste trabalho estão as colinesterases a qual tem sua atividade inibida por carbamatos e organofosforados (Colovic, 2013). A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima responsável pela terminação da transmissão do impulso nervoso e sua inibição é um dos mais antigos biomarcador já estabelecido e é mais confiável do que a determinação analítica do teor de pesticidas para o diagnóstico de envenenamento, pois se refere a um efeito fisiológico diretamente ligado a toxicidade e ao modo de ação de pesticidas em amostras ambientais, que podem persistir por muito tempo (Fulton & Key 2001; Dutta e Arends, 2003). Já a butirilcolinesterase, apesar de não ter sua função totalmente elucidada, é conhecida por catalisar a hidrólise de acetilcolina, embora de forma menos eficiente do que AChE.

Além destas enzimas, Bagchi et al. (1995) descobriram que diferentes classes de pesticidas podem induzir *in vitro* e *in vivo*, a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e alterações em antioxidantes estimuladas por contaminantes (Banerjee et al., 1999) como é o caso das enzimas superóxido-dismutase, glutatona-peroxidase, glutatona-S-transferase e glutatona-redutase (Bagchi et al., 1995; Hai et al., 1997).

Os ROS são associados com diferentes processos patológicos envolvidos na etiologia de muitas doenças de peixes e também podem ser um mecanismo de toxicidade em organismos aquáticos expostos a poluentes (Banerjee et al., 1999). Portanto, a análise de antioxidantes é particularmente relevante para compreender os efeitos deletérios de muitos pesticidas ou outros poluentes ambientais relacionados, como os metais (Monteiro et al., 2006), pois apontam para outras vias de monitoramento através do estresse oxidativo gerado (Javed, 2016) e para a utilização como antídoto contra intoxicações (Tuovinen et al., 1994;

Masson et al., 1998), além de parâmetros de validação para os resultados obtidos com a acetilcolinesterase.

Os biomarcadores de estresse oxidativo têm sido amplamente utilizados em estudos experimentais na avaliação dos efeitos de poluentes em condições *in vivo* e *in vitro*. Nestes casos tem se mostrado uma ferramenta importante já que o desequilíbrio no balanço óxido-redutor celular é defendido por muitos como o princípio dos efeitos deletérios sobre a célula.

O presente trabalho tem como principal objetivo utilizar marcadores bioquímicos de *Cichla ocellaris* no monitoramento ambiental do Lago de Itaparica-PE, no nordeste do Brasil. Esta espécie, segundo (Fontenele, 1948; Silva et al., 1980) é originária da bacia amazônica, de hábito alimentar carnívoro e tem demonstrado considerável eficiência no controle de peixes invasores em represas; sedentária, que não realiza migrações, (característica capaz de evidenciar diferenças entre os locais de amostragem) e vive em lagos, lagoas e na boca e beira dos rios. Foi introduzido em reservatório no Rio São Francisco e possui uma grande importância econômica e alimentar.

2 MATERIAL E MÉTODO

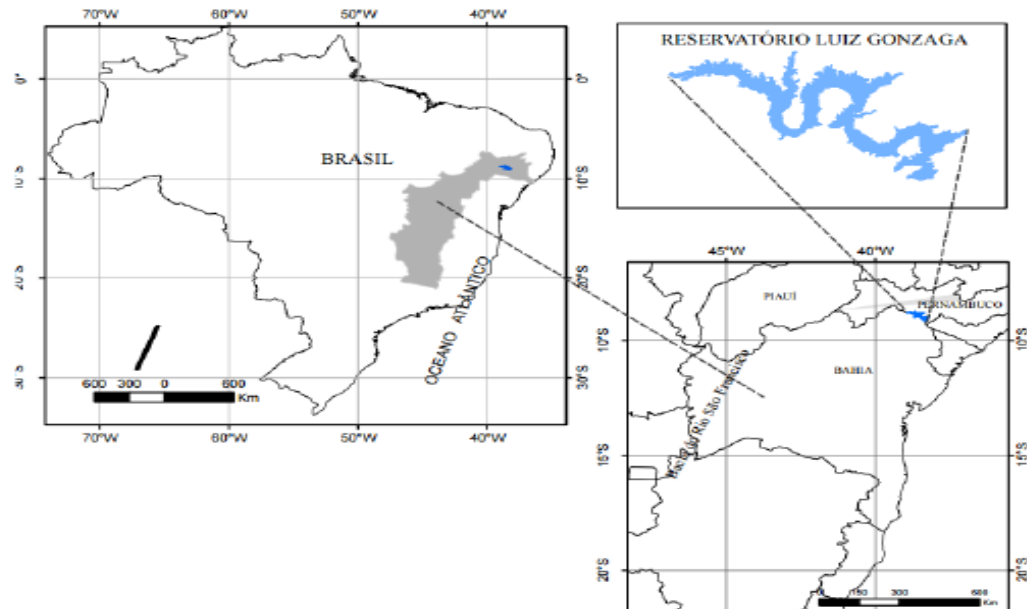
2.1 ÁREA DE ESTUDO

O Reservatório de Itaparica, inserido na Bacia do Rio São Francisco no semi-árido do nordeste brasileiro, tem um significado particular para captação de água potável, irrigação, aquicultura, geração de energia hidroelétrica e outros fins de exploração da água. Possui uma entrada regulada de $2060 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$, um comprimento de 149 Km, profundidade máxima de 101 m e a profundidade média é de 13 m, com tempo de residência média de 60 dias (CHESF, 2011). De acordo com a classificação de Köppen, o clima da área é semi-árido de estepes BShw' (clima semi-árido quente e seco com chuvas de verão-outono), com temperatura média anual de 26°C , e se caracteriza pela alta evaporação, chuvas médias anuais entre 410 e 610 mm, com duas estações sazonais definidas. O período seco ocorre no inverno e a altura de chuva do mês úmido alcança dez vezes a altura de chuvas do mês mais seco. Dados da Codevasf (ano) indicam que o período chuvoso, nesta área, estende-se de janeiro a maio, resultando subsequentemente em uma estação seca com duração de sete meses.

O reservatório de Itaparica (fig.1) entrou em operação, em 1988, com a inundação de mais de 800 km^2 da antiga cidade de Petrolândia que teve suas terras submersas, acumulando cerca de 11 bilhões de metros cúbicos de água para a formação do lago de Itaparica (fig. 01), onde está instalada a Usina Hidrelétrica Luíz Gonzaga. O município é atravessado pelo rio

São Francisco e por afluentes temporários de menor importância: riacho dos Mandantes e Barreiras, onde foram reassentados os moradores da nova cidade através da criação de três principais Projetos Agrícolas: Barreiras (B), Apolônio Sales (AS) e Icó Mandantes (IM) (tabela. 01).

Figura 1- Localização da área de estudo.



Fonte: Lopes et al (2013)

2.1.1 Amostras Biológicas

Nas proximidades dos projetos acima citados foram coletados 10 exemplares jovens de *Cichla ocellaris* em cada ponto, durante as estações chuvosa e seca dos anos de 2015 e 2016. Por não existir uma região livre de contaminação, foi realizada a coleta de 10 exemplares dessa mesma espécie e aclimatados na sede da Codevasf em Penedo-AL, para ser usado como controle negativo, depois de um período de depuração

2.2 ANÁLISE DE METAIS

Os nove metais contaminantes, Arsênio (AS), Cobre (Cu), Cádmio (Cd), Cromo (Cr), Chumbo (Pb), Ferro (Fe), Manganês (Mn), Zinco (Zn) e Mercúrio (Hg), foram quantificados na amostra de água dos pontos de coleta. A análise do íon mercúrio foi realizada no Instituto Tecnológico de Pernambuco (ITEP) de acordo com o método Absorção Atômica por Vapor Frio 3112B do Standart Methods Apha, (1998). As análises dos íons Ferro total, Manganês, Cádmio, Chumbo, Cobre, Cromo e Zinco foram feitas no Laboratório de Análises Minerai

Solos e Água (LAMSA) no Departamento de Engenharia Química da UFPE, utilizando Espectrofotometria de Absorção Atômica (Aparelho CG AA 7000 BC), a metodologia usada foi Standard Methods for Examination of Water and Wastewater Apha, (1998).

As concentrações de metais mensuradas na água foram comparadas com valores de referência para água doce ("classe 2" de acordo com a legislação CONAMA Resolução 357/2005, CONAMA – 2005).

2.3 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

Os parâmetros físico-químicos Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$), Sólidos Dissolvidos (mg/L), O (mgO_2/L) /L), OD% , Temperatura da água ($^{\circ}\text{C}$) e pH foram mensurados utilizando multiparâmetro.

2.4 DADOS PLUVIOMÉTRICOS

Os dados pluviométricos foram obtidos no *Site* da Agência Pernambucana de Águas e clima (APAC -2016) e no Boletim de Monitoramento do reservatório do Rio São Francisco, Brasília, v11, setembro, 2016

2.5 COLINESTERASES

As atividades das enzimas acetil e butirilcolinesterase foram determinadas no cérebro, e fígado através do método colorimétrico de Ellman et al. (1961) modificado por Assis et al. (2010): os tecidos foram homogeneizadas até a concentração de 20 mg de tampão/mL de tecido. Em seguida, foram centrifugados coletando-se o sobrenadante o qual foi adicionado ao reagente cromogênico DTNB. Os substratos acetil ou butiriltiocolina foram adicionados imediatamente antes da leitura a 405 nm durante 3 min.

2.6 ENZIMAS DO ESTRESSE OXIDATIVO

Para a atividade das enzimas do estresse oxidativo foram feitos homogenatos de fígado. Os animais foram sacrificados, o fígado rapidamente removido e mantido em solução salina (NaCl 0,9%). O tecido foi homogeneizado em 10 volumes de salina gelada 0,9% (pH = 7.0) usando um homogeneizador de vidro e centrifugado a 1000 x g por 10 minutos a 4°C.

2.6.1 Peroxidação Lipídica (PL)

PL foi medida por meio da estimativa dos níveis de malondialdeído (MDA) usando o ácido tiobarbitúrico (TBA), pelo método TBARS, de acordo com Ohkawa et al. (1979). Na

reação de teste TBARS, MDA ou MDA como substâncias e TBA reagem para produzir um pigmento rosa com máximo de absorção a 532nm. A reação foi desenvolvida através da adição sequencial de 80µl de dodecil sulfato de sódio 8,1%, 600µl de ácido acético 20% (pH 3,5) e 600µl de soluções TBA 0,8%. Essa mistura foi incubada em banho-maria com temperatura fervente durante 60 min e depois esfriada em água corrente. Após o arrefecimento da água da torneira, 600µl de n-butanol foi adicionada a amostra, centrifugou-se a 2500g durante 10 minutos e a fase orgânica foi lida a 532nm utilizando um leitor de placas (Thermo Scientific, flash varioskan varredura espectral leitor multimodo). Os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos como nmol por mg de proteína utilizando uma curva padrão gerada usando concentrações diferentes solução de 1,1,3,3-tetrametoxi propano.

2.6.2 Superóxido Dismutase total (t - SOD)

A avaliação da atividade da SOD total (t - SOD) foi realizada de acordo com Misra e Fridovich, (1972) à 25°C. Triplicatas de homogenatos de fígado (60 uL) foram previamente incubadas num banho de água a 37°C e , em seguida, adicionado a 920µL de 0,05% de carbonato de sódio tampão pH 10,2 em 0,1 mM de EDTA. A reação foi desenvolvida através da adição de 20 uL de 150 mM de epinefrina em ácido acético a 0,05 % . A absorbância foi lida a cada 15 segundos para um total de 2 min, a 480nm. Uma unidade de t - SOD foi definida como a quantidade de enzima que provoca 50 % de inibição da oxidação da epinefrina. A atividade enzimática da t- SOD dos tecidos foi expressa em unidades por miligrama de proteína (U / mg de proteína L).

2.6.3 Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi medida de acordo com Aebi (1984). Triplicatas dos homogenatos de fígado (60 uL) foram adicionados a 905µL de tampão de fosfato de sódio pH 7,0 . A reação foi iniciada através da adição de 35µL de peróxido de hidrogénio 300 mM em tampão de fosfato de sódio . A constante k da taxa de decomposição de H₂O₂ sob as nossas condições experimentais de temperatura (~22°C) e pH (7,0) foi determinado como sendo 2,3 por medição das alterações de absorvência por 10 seg , durante 1,5 min a 240nm . A atividade enzimática também foi expressa em unidades por miligrama de proteína (U / mg de proteína) .

2.6.4 Níveis de Glutathiona Reduzida (GSH)

Os níveis de GSH foram analisados segundo o método de HISSIN e HILF (1976). Foram adicionados 1,8 mL de tampão fosfato-EDTA (pH = 8.0) mais 100 µL de solução de orto-ftaldeído (OPT) utilizados a 100 µL do sobrenadante, obtendo-se assim, uma solução final de 2 mL. Esta solução foi incubada por 20 minutos à temperatura ambiente e protegida da luz. Logo após foi feita leitura em espectrofluorímetro utilizando o comprimento de onda de 350 nm para emissão. Previamente, foi preparada uma curva padrão com concentrações de GSH entre 0,01 – 1 mM.

2.6.5 Níveis de Glutathiona Oxidada (GSSG)

Os níveis de GSH foram analisados segundo o método de HISSIN e HILF (1976). Brevemente, 0,5 mL do sobrenadante de homogenado foi incubado à temperatura ambiente com 200 µL de 0.04 M NEM por 30 minutos para interagir com a GSH presente no tecido. Para esta mistura, 4,3 mL de NaOH 0.1 N foi adicionado. Para medir os níveis de GSSG, 100 µL desta mistura foi utilizada usando o mesmo procedimento descrito para o ensaio de GSH, exceto que 0.1 N NaOH foi utilizado como diluente ao invés de tampão fosfato-EDTA.

2.7 CONCENTRAÇÃO PROTÉICA

Os dados de atividades enzimáticas foram normalizados pelas respectivas concentrações protéicas totais. Tais valores foram quantificados pelo método de Bradford (1976), utilizando-se soro albumina como padrão.

2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

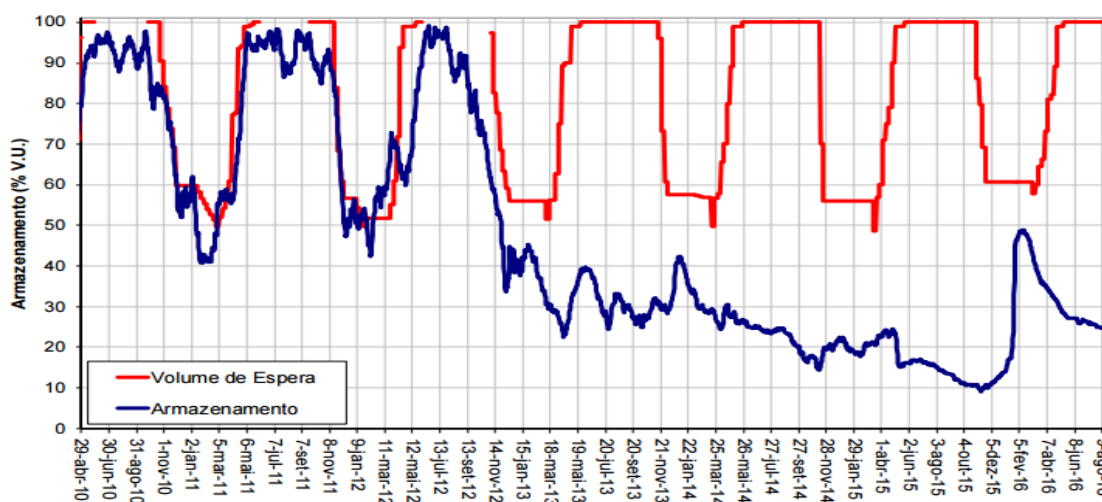
A construção do banco de dados e as análises estatísticas para enzimas detoxificadoras foram desenvolvidas no programa Graphpad Prisma 5 (GraphPad Software, CA, USA). Para determinação de normalidade dos dados, foram utilizados os testes de normalidade Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. Diferenças entre grupos foram avaliadas utilizando-se ANOVA ou Ranks-ANOVA seguido do teste Tukey ou Student Newman-Keuls como pós teste. Diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significativas quando $p \leq 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 DADOS PLUVIOMÉTRICOS

Com base nos dados de acompanhamento dos níveis e das vazões afluentes do reservatório de Itaparica (ANA, 2010; ONS, 2016;), nos últimos dez anos, esse reservatório registrou variação de nível nos períodos seco e chuvoso (Figura 2). Nos anos de 2010 a 2012 foram observados níveis baixos críticos por curtos períodos, seguidos de recuperação. Contudo, a partir do final de 2012, devido ao evento da seca registrada na região, o sistema não apresenta os mesmos episódios de recuperação de nível registrados nos anos anteriores e esses episódios seguem até a presente data.

Figura 2. Variação de nível no reservatório de Itaparica de abril/2010 a agosto/2016



Fonte: Boletim de Monitoramento do reservatório do Rio São Francisco, setembro, 2016.

3.2 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

Os parâmetros físico-químicos foram analisados na água de superfície e estão representados na tabela 2. A temperatura apresentou variação entre as estações com maior elevação durante o período de chuvas que, nesta região, equivale ao verão. Foram registrados pH neutro na maioria dos pontos, enquanto que valores levemente alcalinos foram observados durante a estação chuvosa. Em todos os pontos amostrados a quantidade de oxigênio dissolvido está dentro da faixa da legislação.

Tabela 2. Parâmetros físico-químicos das amostras de água coletadas durante as estações chuvosa e seca de 2015 e 2016, próximo aos Projetos de Irrigação no Lago de Itaparica, PE, Brasil

Locais de Coleta/Estação		Parâmetros Físico-Químicos			
		Temperatura (°C)	Ph	OD(mgO ₂ /L)	OD%
BARREIRAS	CHUVOSO 2015	32	8.0	9.3	125
	SECO 2015	25	7.2	8.1	100
	CHUVOSO 2016	33	8.0	7.4	99
	SECO 2016	24	7.1	8.2	90
APOLÔNIO SALES	CHUVOSO 2015	34	8.0	8.5	99
	SECO 2015	23	6.4	7.5	87
	CHUVOSO 2016	32	8.2	8.9	100
	SECO 2016	22	7.5	7.8	90
ICÓMANDANTES	CHUVOSO 2015	32	8.1	8.2	99
	SECO 2015	23	7.2	7.4	88
	CHUVOSO 2016	31	8.2	8.0	100
	SECO 2016	25	7.4	8.0	89
CONAMA nº357/2005 VMP*		ND	6,0 a 9,0	≥5	ND

*VMP (mg/L) = valor máximo permitido (Resolução CONAMA 357/2005, estabelecido para águas doce classe 2). ND = Não Definido

3.3 ANÁLISES DE METAIS

Tabela 3. Concentração de Metais em projetos de irrigação no Lago de Itaparica durante as estações chuvosa e seca dos anos de 2015 e 2016

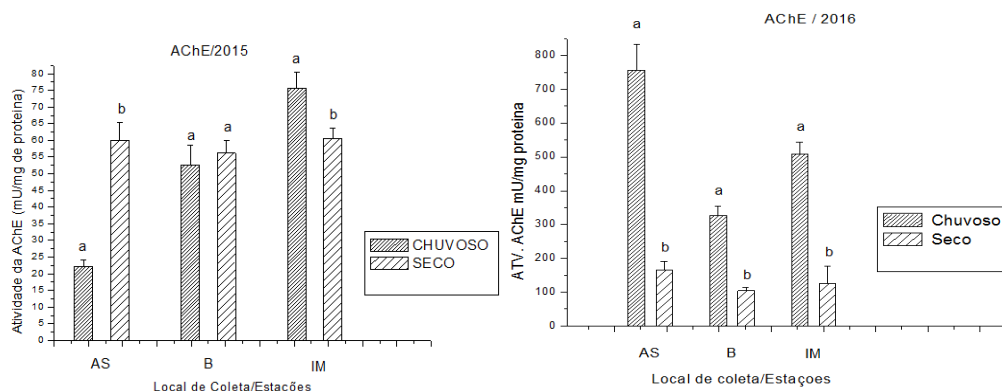
Estações/Locais de coleta	Concentração de metais (mM)								
	AS	Cd	Cr	Cu	Hg	Mn	Pb	Zn	Fe
Resolução Conama nº357/2005 (VMP*)	0,02	1,77	9,61	15,73	0,001	18,20	2,41	3,05	5,37
Chuvoso 2015									
Apolônio Sales	< 0,13	ND**	ND	ND	< 0,01	ND	ND	ND	ND
Barreiras	< 0,13	ND	ND	ND	< 0,01	ND	ND	ND	ND
Icó Mandantes	< 0,13	ND	ND	ND	< 0,01	ND	ND	ND	2,53
Seco 2015	< 0,13								
Apolônio Sales	< 0,13	ND	ND	ND	< 0,01	ND	ND	0,66	ND
Barreiras	< 0,13	ND	ND	ND	< 0,01	ND	ND	0,66	1,60
Icó Mandantes	< 0,13	ND	ND	ND	< 0,01	ND	0,133	0,66	ND
Chuvoso 2016	< 0,13								
Apolônio Sales	< 0,13	ND	ND	ND	< 0,01	1,33	ND	0,66	ND
Barreiras	< 0,13	ND	ND	ND	< 0,01	1,33	ND	0,40	0,80
Icó Mandantes	< 0,13	ND	ND	ND	< 0,01	0,66	ND	0,93	ND
Seco 2016	< 0,13								
Apolônio Sales	< 0,13	ND	ND	ND	< 0,01	ND	ND	ND	3,60
Barreiras	< 0,13	ND	ND	ND	< 0,01	ND	ND	ND	ND
Icó Mandantes	< 0,13	ND	ND	ND	< 0,01	1,20	ND	0,93	ND

*Valor Máximo Permitido

**Não Definido

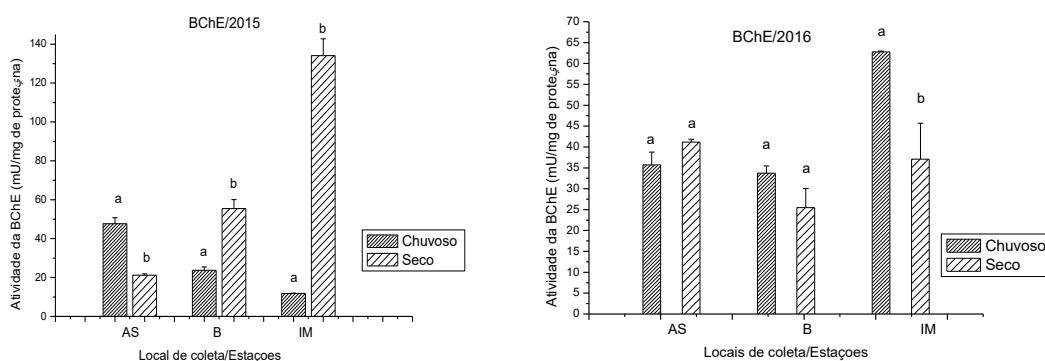
3.4 MACADORES BIOQUÍMICOS

A enzima acetilcolinesterase cerebral apresentou menor atividade durante a estação chuvosa de 2015 ($22,14 \pm 2,01$) no projeto Apolônio Sales. Com exceção do IM os demais pontos amostrados apresentaram diferenças significativas entre as estações. No período de chuva houve diferença entre todos os pontos, ao contrário do período seco.



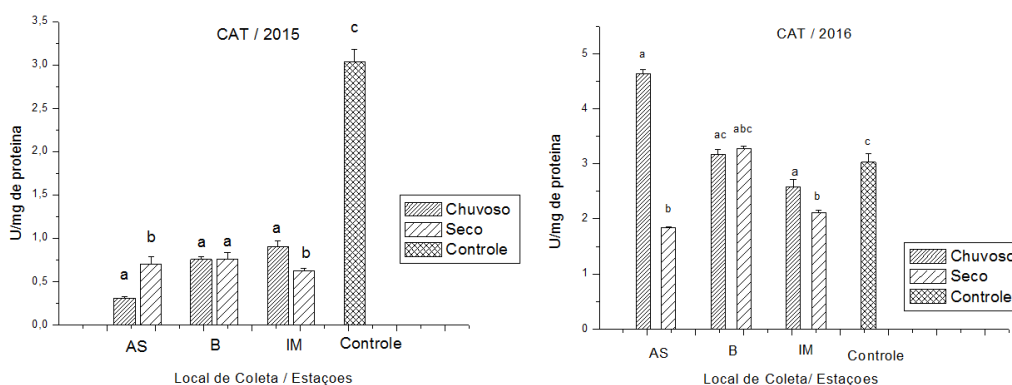
Atividade da Acelilcolinesterase (AChE) de *Cichla ocellaris* obtidos em projetos de irrigação no Lago d Itaparica durante as estações chuvosa e seca de 2015 e 2016. Letras diferentes dentro dos pontos de coleta indicam $p < 0,05$.

A enzima Butirilcolinesterase no fígado apresentou diferença significativa durante as estações do ano de 2015 apenas para o projeto IM. No período de chuva não houve diferença entre os pontos. No período seco o IM mostrou atividade diferente em relação aos demais. O projeto B e o AS não apresentaram diferenças significativas entre si para essa mesma estação.



Devido a ausência de um local livre de contaminação, não foi realizado um controle para as enzimas colinesterases, uma vez que as mesmas podem ser inibidas de forma irreversível na presença de alguns pesticidas.

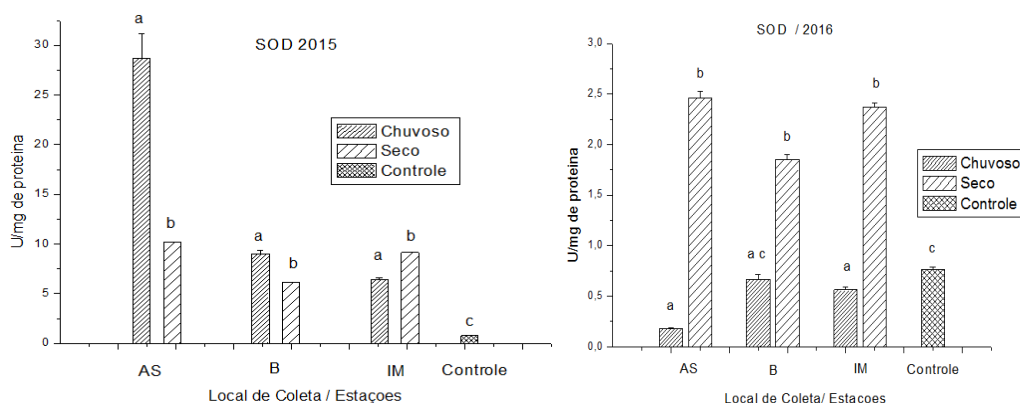
Assim como a acetilcolinesterase, a catalase apresentou menor atividade no projeto AS ($0,30 \pm 0,01$) durante o período chuvoso de 2015. Neste mesmo período só existiu diferença entre o projeto IM e AS ($p < 0,05$), sendo o B semelhante aos dois. No período seco o IM apresentou uma menor atividade desta enzima em relação aos demais pontos. Durante as estações, a catalase não variou significativamente no projeto B, já no AS e IM existiu uma variação oposta da atividade dessa enzima durante as estações. O AS apresentou menor atividade para o período chuvoso, enquanto que o IM apresentou maior atividade nesse mesmo período quando comparado ao período seco. Este mesmo fato também foi observado com a atividade da butirilcolinesterase. Em 2016, a CAT no AS apresentou atividade inversa ao ano de 2015, com uma média maior no período chuvoso. O B não demonstrou diferenças entre as estações e o IM teve maior média no período chuvoso. Para este ano, todos os pontos amostrados apresentaram aumento da atividade da CAT em todas as estações com maior média no período chuvoso, exceto o B que aumentou sem diferenças significativas entre as estações.



Atividade da catalase de *Cichla ocellaris* obtidos em projetos de irrigação no Lago d Itaparica durante as estações chuvosa e seca de 2015 e 2016. Letras diferentes dentro dos pontos de coleta indicam $p < 0,05$.

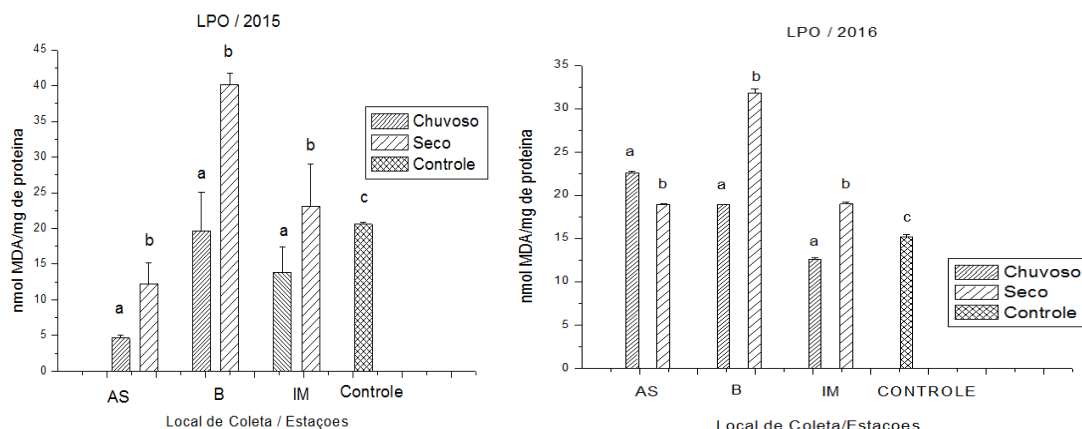
Em 2015, a SOD também se comportou como as demais enzimas que apresentaram atividades invertidas durante as estações para os pontos de coleta IM e AS. A maior média para a SOD foi no projeto AS durante a estação chuvosa ($28,58 \pm 0,26$). Nessa mesma estação apenas o IM e AS apresentaram diferenças significativas. No período seco, quando comparado ao período chuvoso, teve uma diminuição da atividade da SOD em todos os pontos com diferenças significativas para o AS e o B. No ano seguinte a enzima teve sua atividade debelada em todos os pontos e estações. O AS e B teve maior atividade dessa enzima no período seco, fato contrário ao ano de 2015. Já o IM continuou apresentando maior

atividade no período seco. Em relação ao controle, a SOD apresentou maior atividade em todas as estações de 2015 e também no período seco de 2016.



Atividade da SOD de *Cichla ocellaris* obtidos em projetos de irrigação no Lago de Itaparica durante as estações chuvosa e seca de 2015 e 2016. Letras diferentes dentro dos pontos de coleta indicam $p < 0,05$.

Para o ano de 2015 a peroxidação lipídica foi diferente em todos os pontos durante a estação seca e chuvosa com $p = 0,0004$ para o projeto B e AS, e $p = 0,0059$ para o projeto IM. Os valores de peroxidação foram maiores durante o período seco e a diferença entre os pontos de coletas, nas duas estações, ocorreu entre o AS e B. No ano seguinte, a peroxidação foi maior que o controle em todos os pontos, exceto para o IM no período chuvoso.



Peroxidação Lipídica de *Cichla ocellaris* obtidos em projetos de irrigação no Lago de Itaparica durante as estações chuvosa e seca de 2015 e 2016. Letras diferentes dentro dos pontos de coleta indicam $p < 0,05$.

5 DISCUSSÃO

Este estudo utilizou o Tucunaré, *C. Ocellaris*, como espécie sentinela e mostrou diferenças significativas nos biomarcadores do estresse oxidativo e neurotóxicos de peixes coletados no Lago de Itaparica, relacionadas às características sócio-econômicas e de uso da terra nos três projetos de irrigação estudados.

Às margens do reservatório de Itaparica existem perímetros irrigados que remetem ao uso abundante de pesticidas e fertilizantes devido à má qualidade do solo. Estes produtos infiltram no solo e são carregados para o rio, sendo ainda mais lixiviados quando chove e o nível do reservatório se eleva, pois as áreas marginais alagam e contribuem para o grande aporte de nutrientes no Lago (Melo, 2007).

Outro fator que contribui para esse carreamento de contaminantes no Lago é a irrigação por drenos que está presente nos projetos estudados, mas se sobressai no Icó Mandantes que, por essa razão, ainda no período seco, continua a receber aportes de pesticidas. A última ampliação desse sistema foi concluída em 2010. A rede de drenagem ficou com 235 km de extensão, sendo 137 km no Bloco-3 e 98 km no Bloco-4. Do total da rede de drenos instalada, 191 km são tubos enterrados ou coletores subterrâneos e 44 km são drenos superficiais abertos (HIDRO SONDAS, 2012).

Além disso, esse projeto é o maior em área irrigada em relação aos demais, mesmo muitos desses lotes tendo sido descartados devido à salinização do solo e ao uso excessivo de pesticidas. Outro fato relevante é a presença do riacho Mandante que desemboca no Lago próximo ao ponto de coleta (APAC, 2013).

De acordo com Sobral et al (2007) a água do sistema de drenagem superficial escoar naturalmente para o reservatório, apesar do relevo pouco acidentado, e é altamente degradada pela adição de sais, pesticidas, metais pesados e sedimentos, fato intensificado com a prática inadequada da irrigação que usa água em quantidade excessiva.

Diante das condições de drenagem insatisfatória no projeto AS foi implementado um sistema de drenagem subterrâneo capaz de coletar e escoar o excesso de líquido infiltrado no solo.

O uso da água do reservatório para implantação da aquicultura em tanques próximos às margens está bastante evidenciado nos três projetos de irrigação, com destaque para o IM em que estudos anteriores mostram a influência dos mesmos na alteração da qualidade da água através do grande aporte de nutrientes que o reservatório recebe, induzindo a eutrofização (Nailza, et al., 2015; Sobral et al., 2007). Todas estas características permitem o escoamento contínuo de xenobióticos que contribuem para uma perturbação em nível bioquímico dos processos vitais dos organismos aquáticos.

Muitos poluentes ambientais podem induzir tanto a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e mudanças nas atividades de enzimas do complexo antioxidante como a

SOD e a CAT, que têm sido propostas como indicadores de estresse oxidativo mediado pelo poluente.

A SOD tem como substrato o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) cuja concentração é aumentada por fatores estressantes, incluindo xenobióticos como os pesticidas (Bagchi et al., 1995; Hai et al., 1997; Ferrari et al., 2007). A SOD libera oxigênio molecular e peróxido e, em seguida, a CAT facilita a remoção do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é transformado em água e oxigênio molecular. A redução da atividade da CAT nos peixes tem sido relacionada à presença desses mesmos xenobióticos (Toni et al., 2010; Yonar e Sakin, 2011). Braun et al. (2006) observaram aumento da atividade desta enzima na espécie *Rhamdia quelen*, relacionado também às baixas concentrações de oxigênio dissolvido na água. No presente trabalho, o oxigênio dissolvido não foi um fator limitante, variando de 7,4 a 9,3 mgO₂/L.

No presente estudo, a CAT apresentou atividade reduzida, em relação ao grupo controle, no ano de 2015, para os pontos amostrados. Neste mesmo ano, a SOD teve sua atividade aumentada, em relação ao controle, em todas as estações dos pontos amostrados. Os projetos AS e IM apresentaram médias invertidas para estas duas enzimas nas duas estações de 2015. No AS a SOD teve maior atividade no período chuvoso e o IM teve maior atividade no período seco. Em 2016, a CAT foi maior no AS durante o período chuvoso e no IM foi maior no período seco.

Altas atividades da SOD geram maiores quantidades de H_2O_2 , que por sua vez são hidrolisados não só pela CAT, mas também pela glutathione peroxidase (GPx) e o descompasso entre as atividades da SOD e da CAT podem denotar maior atividade da GPx (não avaliada no presente trabalho) ou deficiência de parte do complexo antioxidante, resultando no estresse oxidativo (Bagchi et al., 1995; Hai et al., 1997; Ferrari et al., 2007; Oga et al., 2008).

No presente trabalho, observou-se redução da atividade da CAT do fígado dos peixes durante a estação chuvosa, quando o oxigênio e a temperatura encontravam-se mais elevados em relação ao período seco. Ferrari et al., (2007) avaliaram a atividade da CAT, hepática e renal, em *Oncorhynchus mykiss* exposto a uma mistura de pesticidas (carbaril e azinfós-metílico). Os autores observaram a inibição bem como a indução de CAT. Foi reportado que em concentrações mais altas dos pesticidas a atividade da enzima diminuía e em concentrações mais baixa, ocorria aumento dessa atividade.

Para melhor entender a dinâmica de contaminação presente nos pontos estudados, avaliou-se a razão entre a SOD e a CAT (SOD/CAT) uma vez que, como mencionado acima,

estas enzimas trabalham juntas, em sequência, convertendo em condições fisiológicas, o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a H_2O_2 e este a H_2O . (Halliwell; Gutteridge, 1999). Quanto maior a razão SOD/CAT, em relação ao controle, maior é a concentração de H_2O_2 , uma vez que a atividade da SOD está aumentada e a da CAT reduzida.

A razão SOD/CAT apresentou-se significativamente aumentada no ano de 2015 ($p < 0,05$). A média da razão SOD/CAT foi: AS = $95.6 \pm 4,03$; B = $12.86 \pm 1,02$; IM = $8 \pm 0,03$ e grupo controle = $0,2 \pm 0,001$; sugerindo, desta forma, que a SOD está trabalhando na conversão do $O_2^{\cdot-}$ em níveis basais ou acima de sua atividade, enquanto que a CAT não está conseguindo converter todo o H_2O_2 formado.

Ali et al. (1992) observaram que o metil-mercúrio (MeHg) aumenta a produção do ânion $O_2^{\cdot-}$, que é capaz de inibir a atividade da CAT (Kono; Fridovich, 1982; Shimizu; Kobayashi; Hayashy, 1984). Uma vez que a produção de $O_2^{\cdot-}$ aumenta, há também a ativação da SOD, já que o $O_2^{\cdot-}$ é o principal ativador alostérico desta enzima. A ativação da SOD e a inibição da CAT, resulta em um aumento na concentração de H_2O_2 (e na razão SOD/CAT), e este excesso facilita a produção do radical hidroxila ($OH^{\cdot}$), um poderoso oxidante molecular (Halliwell, 2006)

Em 2016, com o aumento das chuvas e subsequente aumento do volume do reservatório de Itaparica, as enzimas SOD tiveram suas atividades reduzidas (para aproximadamente 10% da atividade de 2015) em relação ao ano anterior devido à diluição dos compostos indutores da formação de $O_2^{\cdot-}$ na água do reservatório. Porém, mesmo com a redução da SOD em todos os pontos, no período seco sua atividade ainda apresentou-se maior que o controle em todos os pontos amostrados. A CAT aumentou em relação ao ano de 2015, mas apenas no AS (no período chuvoso) foi maior que o controle. Para este ano, a razão SOD/CAT apresentou-se maior que o controle apenas no período seco. Este fato mostra a influencia do volume do reservatório e da chuva, que além de carrear contaminantes, pode diluí-los. Já o período seco provavelmente concentra a carga de xenobióticos que o lago recebe.

A atividade das enzimas do complexo antioxidante pode ser induzida pela produção aumentada de ROS como um mecanismo de proteção contra o estresse oxidativo ou inibida quando a deficiência do sistema ocorre, sugerindo toxicidade (Winston e Di Giulio 1991; Cossu et al., 1997). A resposta enzimática para produtos químicos tóxicos mostra um formato de sino, com um aumento inicial na atividade devido à indução enzimática, chegando a um pico, seguido de uma diminuição dessa atividade, devido à taxa catabólica aumentada e/ou

inibição direta por contaminantes tóxicos (Viarengo et al., 2007). Por conseguinte, a baixa atividade enzimática da CAT em peixes do lago de Itaparica, pode ser associada à deficiência em compensar o estresse oxidativo, possivelmente devido a altos níveis de exposição aos poluentes.

Enzimas como a SOD e CAT podem ser preventivas dos processos degenerativos causados por espécies reativas do oxigênio. A peroxidação lipídica (LPO) é um processo degenerativo que afeta os ácidos graxos poliinsaturados de fosfolipídios de membrana. O mecanismo geral deste processo envolve a formação de aldeídos tóxicos, os quais reagem com proteínas, DNA e outras moléculas, resultando em mudanças generalizadas nas membranas celulares (Dikshith 1991). A peroxidação lipídica, no presente estudo, foi maior durante o período seco em todos os anos, exceto para o AS no período chuvoso de 2016, confirmando a alteração das enzimas para esta estação.

Os pontos de coletas do presente estudo retratam bem estas duas visões que a literatura apresenta em relação ao monitoramento ambiental ao longo das estações. As diferenças aqui encontradas são atribuídas a dinâmica sócio-ambiental de cada ponto de coleta que além do aporte de água da chuva, recebe água de afluentes temporários e principalmente da irrigação, através de drenos.

As diferentes atividades dessas enzimas, apresentadas entre os pontos amostrais, revela a dinâmica de carreamento dos contaminantes existentes em cada um deles e sugere a exposição aguda e crônica da espécie estudada

Dentro o passado e também recentemente, o reservatório apresentou problemas de qualidade de água com fitoplâncton desenvolvimento de massa e cianobactérias (*Cylindrospermopsis raciborskii*) elevações de concentração de fósforo alterou significativamente a qualidade da água (Gunkel e Sobral 2013).

A existência de vários perímetros irrigados nas margens do reservatório tem tido como consequência, o uso indiscriminado de agroquímicos que se infiltram no solo e são lixiviados para o reservatório, o que é intensificado quando o nível do reservatório eleva-se, pois as áreas marginais são alagadas, carreando nutrientes que favorecem o desenvolvimento do plâncton e de macrófitas pela eutrofização (Melo, 2007).

Organofosforados e carbamatos são grupos de compostos químicos bastante difíceis de serem analisados quimicamente devido à sua alta volatilidade e baixa persistência no ambiente. Como apresentam a capacidade de causar a inibição da atividade de acetilcolinesterase, esta enzima é bastante útil no diagnóstico de intoxicações por esses

compostos. Por serem relativamente não persistentes em ambientes aquáticos, sua aplicação é constante em algumas culturas e sua detecção em programas de monitoramento através da inibição da atividade da AChE apresenta bons resultados uma vez que tais compostos podem permanecer ligados ao sítio ativo da enzima durante dias ou semanas (Sturm et al., 1999; Assis et al., 2010; Assis et al., 2012; Silva et al., 2013; Araújo et al., 2016).

O principal efeito de pesticidas organofosforados e carbamatos é a inibição da AChE, este fato provoca o acúmulo de acetilcolina nas fendas sinápticas e pode causar tremores, convulsões e até a morte do organismo (Fulton e Key, 2001). Em paralelo com os efeitos deletérios do excesso de acetilcolina nas sinapses, há um alto custo energético que envolve diretamente atividades fisiológicas, causando alterações comportamentais (Beauvais et al., 2002; Jarrard et al., 2004; Kavitha e Rao, 2007; Kumar et al., 2011.; Mohapatra et al., 2012.; Clasen et al., 2014.; Narra et al., 2015). Em peixes, o estresse causado por pesticidas pode provocar privação do equilíbrio, alteração da velocidade do nado, hiperatividade, reduzindo a capacidade de competir por alimento e de se proteger do indivíduo (Beauvais et al., 2002; Jarrard et al., 2004). Além disso, a exposição aos pesticidas anticolinesterásicos pode prejudicar o desenvolvimento neural, uma vez que funções de diferenciação e adesão das células neurais estão sendo atribuídas às ChEs (Balasubramanian e Bhanumathy, 1993; Chatonnet e Lockridge, 1989; Silman e Sussman, 2005; Pezzementi e Chatonnet, 2010). Estes efeitos acometem diretamente as taxas de crescimento e sobrevivência (Kumar et al., 2011.; Jordaan et al., 2013).

Silva e colaboradores, (2013), caracterizaram a AChE cerebral de Tucunaré (*C. ocellaris*) e observaram o efeito de pesticidas organofosforados e carbamatos e metais pesados. Os autores relataram que a atividade desta enzima é extremamente sensível ao efeito dos pesticidas diclorvós, tetraetil-pirofosfato (TEPP), carbofuran e carbaril; e também aos metais Hg^{2+} e As^{3+} podendo assim ser empregada como uma ferramenta eficaz para o monitoramento ambiental para esses pesticidas e metais pesados.

No presente estudo, a atividade da AChE de *C. ocellaris*, assim como a SOD e a CAT, apresentou valores invertidos para os perímetros irrigados AS e IM durante as estações do ano de 2015. No AS a enzima foi fortemente inibida durante o período chuvoso e no IM a inibição foi maior durante o período seco. Este fato pode estar associado à presença dos drenos que mesmo durante a ausência de chuva, continua a carrear poluentes diretamente para o rio. Apesar de ambos os projetos apresentarem sistemas de drenagem, o IM possui maior perímetro irrigado e apresenta também maior quantidade de agrovilas e pisciculturas

diretamente no reservatório, fato que aponta para diversas fontes de contaminantes e uma maior capacidade de contaminação durante a estação seca.

Mais recentemente, diversos estudos têm indicado que as colinesterases também são sensíveis a outros tipos de contaminantes ambientais, tais como detergentes e misturas complexas de poluentes (Gill; Tewari; Pande, 1990; Payne et al., 1996; Guilhermino et al., 1998; 2000).

Para esta enzima, não foi considerado o grupo controle realizado neste estudo devido à inexistência de um local livre de contaminantes e pelo fato de alguns pesticidas inibirem a enzima de modo irreversível, o que torna o tempo de depuração sem efeito.

Apesar da efetividade da medida da atividade acetilcolinesterase como biomarcador, a legislação brasileira (CONAMA, 2005) ainda não preconiza sua utilização no diagnóstico de contaminação ambiental por estes compostos e poucos são os estudos com peixes nativos.

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho revelou efeitos deletérios, na espécie em estudo, dos poluentes oriundos dos projetos de irrigação, mesmo em baixas concentrações (metais pesados), sugerindo um potencial efeito toxicológico das misturas desses poluentes com outros contaminantes (agrotóxicos e cianotoxinas) nos ambientes amostrados.

Os marcadores bioquímicos de *Cichla ocellaris*, seja de efeito ou exposição, mostraram-se eficazes para estimar a dinâmica dos contaminantes que ocorrem no lago de Itaparica, sob influência das peculiares características dos projetos de irrigação existentes. Os múltiplos usos da água e do solo em torno do reservatório apontam para uma necessidade de contínuo monitoramento afim de melhor gerir o uso desses recursos.

REFERÊNCIAS

Adam, M. L., Torres, R. A., Sponchiado, G., Motta, T. S., Oliveira, C. M. R., Carvalho-Filho, M. A., & Correia, M. T. S. Environmental degradation at a public park in Southern Brazil as revealed through a genotoxicity test (MN) on peripheral blood cells from *Poecilia vivipara* (Teleostei). *Water, Air, and Soil Pollution*, 211, 61–68, 2010.

Aebi, H. Catalase in vitro. *Method Enzymol.*, 105, 121-126, 1984

Agência Nacional de Águas (Brasil). Boletim de Monitoramento dos Reservatórios do Rio São Francisco / Agência Nacional de Águas, Superintendência de Operações e Eventos Críticos. Brasília: ANA, 2016

Agência Nacional de Águas. Plano Decenal de Bacia Hidrográficas do Rio São Francisco: Plano da Bacia Hidrográfica do Rio São Francisco (2004 a 20013). Brasília, 2004.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Monografia de pesticidas 2003b. Citação e referência a documentos eletrônicos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 06 de novembro de 2015.

Agência Pernambucana de Águas e Clima. Bacias hidrográficas - grupo de bacias de pequenos rios interiores 3 - GI3. Recife: APAC, 2013. Disponível em: <http://www.apac.pe.gov.br/pagina.php>. Acesso em: 12 de jan 2014

Ameur, W.B., et al, 2012. Oxidative stress, genotoxicity and histopathology biomarker responses in mullet (*Mugil cephalus*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) liver from Bizerte Lagoon (Tunisia). Mar. Poll. Bull. 64, 241-151

ANVISA, 2003. Legislação específica para a área de alimentos - contaminantes inorgânicos (metais pesados) em peixes e produtos de pesca. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>.

ANVISA, 2010. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 23 de mar de 2015.

ANVISA, 2010. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 13 de fev de 2015

APAC – Agência Pernambucana de Águas e Clima, 2016. Disponível em: <http://www.apac.pe.gov.br/>. Acesso em: 12 de agosto de 2016

Arruda, Nailza Oliveira de. Controle do aporte de fósforo no reservatório de Itaparica localizado no semiárido nordestino , 2015. 186folhas, Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação Engenharia Civil, 2015.

Bagchi D, Vuchetich PJ, Bagchi M, Hassoun EA, Tran MX, Tang L, Stohs SJ. Induction of oxidative stress by chronic administration of sodium dichromate (chromium VI) and cadmium chloride (cadmium II) to rats. Free Rad Biol Med. 1997;22:471–478

Bagchi, D.; BAGCHI, M.; HASSOUN, E. A.; STOHS, S. J. In vitro and in vivo generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. Toxicology, v. 104, p. 129-140, 1995.

Beauvais, S.L.; COLE, K.J.; ATCHISON, G.J.; COFFEY, M. Factors affecting brain cholinesterase activity in Bluegill (*Lepomis macrochirus*). Water, Air, and Soil Pollution, v. 135, p. 249–264, 2002.

Bocquené, G.; GALGANI, F.; TRUQUET, P. Characterization and assay conditions for use of AChE activity from several marine species in pollution monitoring. Marine Environmental Research, v. 30, p. 75-89, 1990.

Braun, N. et al. Survival, growth and biochemical parameters of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824), juveniles exposed to different dissolved oxygen levels. Aquaculture Research, v.37, p.1524-1531, 2006. Disponível em:

<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2109.2006.01589.x/pdf>>. Acesso em: 21 set. 2015. doi: 10.1111 /j.1365-2109.2006.01589.x.

Brun, G. L.; Mac Donald, R. M.; Verge, J.; Aubé, J.; Chemosphere 2008, 71, 314.

BUSSOLARO, D.; FILIPAK NETO, F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Responses of hepatocytes to DDT and methyl mercury exposure. *Toxicol. In Vitro*, 24, 1491-1497, 2010
Clasen, B. et al. 2014. Cabofuran promotes biochemical changes in carp exposed to rice field and laboratory conditions. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 101, 77-82

CODEVASF. Plano Anual de desempenho dos Serviços da ATER. [Petrolina]: 2007

CODEVASF. Relatório Anual de desempenho dos Serviços da ATER. [Petrolina]: 2003.

CODEVASF. Serviço de Assistência técnica e Extensão Rural destinado aos agricultores reassentados em decorrência da construção da Barragem de Itaparica – Lote 2: Borda do Lago Relatório Final. Petrolina, 1998

Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e do Parnaíba. Cenários para Sub-região Submédio São Francisco: In: Cenários prospectivos para os vales do São Francisco e do Parnaíba: 2009 a 2028. Brasília: CODEVASF, 2010.

Companhia Hidrelétrica do São Francisco. Plano Ambiental de Conservação e Uso do Entorno do Reservatório de Itaparica: Plano Ambiental de Conservação e Uso do Entorno do Reservatório Artificial: CHESF, 2010.

Companhia Hidrelétrica do São Francisco. Projeto de Irrigação IcóMandantes: Plantas do arranjo do sistema de drenagem dos Blocos 3 e Bloco-4. Petrolândia: Convênio CHESF-CODEVASF, 2011.

CONDEPE/FIDEM, 2001. Diagnóstico sócio, econômico, político e cultural de Petrolândia-PE.

D'Autréaux, B.; Toledano, M.B. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v.8, p.813-824, 2007. Disponível: <<http://www.uvm.edu/~vgn/outreach/documents/nrm2256.pdf>> . Acesso em: 27 jun. 2015.

Dutta, H.M., Arends, D.A., 2003. Effects of endosulfan on brain acetylcholinesterase activity in juvenile bluegill sunfish. *Environ. Res.* 91, 157–162

Ferrari, A.; Venturino, A.; D'Angelo, A. M. P. Effects of carbaryl and azinphos methyl on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) detoxifying enzymes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 88, p. 134–142, 2007.

Fulton, M.H., Key, P.B., 2001. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 37–45

Fundação de Desenvolvimento Municipal - FIDEM. Diagnóstico Sócio Econômico e Político de Petrolândia. Recife, 2001

Giacobini, E. in Cholinesterases and Cholinesterase Inhibitors (ed. Giacobini, E.) 181–226 (Martin Dunitz Ltd, London, 2000). 17. Mesulam, M.-M. et al. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *Neuroscience* 110, 627–639 (2002).

Gill, T. S.; Tewari, H.; Pande, J. Use of fish enzyme system in monitoring water quality: effects of mercury on tissue enzymes. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 97: 287-292, 1990

Hai, D.Q.; Varga, S.I.; Matkovics, B. Organophosphate effects on antioxidant system of carp (*Cyprinus carpio*) and catfish (*Ictalurus nebulosus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 117C, p. 83-88, 1997.

Halliwell B (2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme for aerobic life. *Plant Physiol* 141: 312–322.

Hidro Sondas. Hidrogeologia e Construção Ltda. Relatório Gerencial de Operação e Manutenção do Projeto Irrigado Icó-Mandantes. Bloco–03 referente ao mês de dez de 2011, jan/2012.

Hidro Sondas. Hidrogeologia e Construção Ltda. Relatório Gerencial de Operação e Manutenção do Projeto Irrigado Icó-Mandantes. Bloco–03 referente ao mês de dezembro de 2011, jan/2012.

Hissin, P. J. e HILF, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal. Biochem.* 74(1):214-26 (1976)

IBAMA. Instituto brasileiro do Meio Ambiente E Recursos Naturais Renováveis. GEO Brazil 2002. Brazil Environment Outlook. Brasília, 2002.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Petrolândia: IBGE, 2014

INSTITUTO DO MEIO AMBIENTE. Macha no São Francisco é causada por concentração de microalgas, Alagoas, abril. IMA, 2015. Disponível em: <http://ima.al.gov.br/ima-apresentarelatorio-final-sobre-a-mancha-no-sao-francisco>. Acesso em: 21 maio. 2015.

Javed, M., et al. Bioaccumulation, Oxidative Stress and Genotoxicity in Fish (*Channa punctatus*) exposed to a thermal power plant effluent. *ecotoxicology and environmental safety* 127 (2016) 163-169

Jergentz, S.; Mugni, H.; Bonetto, C.; Schulz, R.; *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2004, 46, 345.

Jordaan, M.S, Reinecke, S., Reinecke, A., 2013. Biomarker responses and morphological effects in juvenile tilapia *Oreochromis mossambicus* sequential exposure to the organophosphate azinphos-methyl. *Aquat. Toxicol.* 144-145, 133-140.

Kavitha, P., Ra, J.V., 2007. Oxidative stress and locomotor behaviour response as biomarkers for assessing recovery status of mosquito fish, *Gambusia affinis* after lethal effect of an organophosphate pesticide, monocrotophos. *Pest. Biochem. Physiol.* 87, 182-188

Kimerle, R.A.; MEHRLE JR, P.M.; BERGMAN, H.L. (eds.) *Biomarkers. Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress.* Boca Raton, Lewis Publishers,

Kono, Y., and Fridovich, I. (1982) *J. Biol. Chem.* 257,5751-5754

Kumar, N., et al. 2011. Anti-oxidative and immuno-hematological status of *Tilapia* (*Oreochromis mossambicus*) during acute toxicity test of endosulfan. *Pest. Biochem. Physiol.* 99, 45-52.

Kumar, P.; Hyumkim, K. Deep, Akash. *Recent Advancements in Sensing Techniques Based on Functional Materials for Organophosphate Pesticides. Biosensors and Bioelectronics.* Volume 70, 15 August 2015, Pages 469-481

Larini, L. *Toxicologia dos Inseticidas.* p. 57-86, Sarvier, São Paulo; 1979. 281 p.

Larini, L. *Toxicologia dos Praguicidas.* São Paulo: Editora Manole, 1999.

Li, B. et al. Abundant tissue butyrylcholinesterase and its possible function in the acetylcholinesterase knockout mouse. *J. Neurochem.* 75, 1320–1331 (2000).
Livingstone, D. R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine Pollution Bulletin*, 42: 656-666, 2001

Lopes H.L., Sobral M.C., Gunkel G., Candeias A.L, Melo G.L. (2013) First approach to retrieve chlorophyll-a using remote sensing techniques in Itaparica reservoir, semiarid of Pernambuco, Brazil. In: Gunkel G., Silva J.A.A. de, Sobral M. do C. (Eds.) *Sustainable Management of Water and Land in Semiarid Areas.* Editora Universitária UFPE, Recife, p. 41-59, 2013.

Lopes, H. et al. 2015. Comportamento espacial da clorofila-a no reservatório de Itaparica, rio São Francisco. *Eng Sanit Ambient* | v.20 n.3 | jul/set 2015 | 475-484 Madhusudan Reddy. Narra Chemosphere

Masson, P., Josse, D., Lockridge, O., Viguié, N., Taupin, C. and Buhler, C. (1998) Enzymes hydrolyzing organophosphates as potential catalytic scavengers against organophosphate poisoning. *J. Physiol. Paris* 92, 357 - 362.

Stoichiometric and Catalytic Scavengers as Protection against Nerve Agent Toxicity (PDF Download Available). Available from:
https://www.researchgate.net/publication/295704438_Stoichiometric_and_Catalytic_Scavengers_as_Protection_against_Nerve_Agent_Toxicity [accessed Jan 14 2018].

Melo, G. L. de. Estudo da qualidade da água do reservatório de Itaparica localizado na bacia do Rio São Francisco. 2007. Dissertação. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.

- Melo, G.L. et al. Influência de variáveis ambientais na comunidade fitoplanctônica nos reservatórios receptores do projeto de integração do Rio São Francisco. *Revista Brasileira de Geografia Física* 06, p.1300-1316, 2012.
- Mesulam, M.-M, Guillozet, A., Shaw, P. & Quinn B. Widely spread butyrylcholinesterase can hydrolyze acetylcholine in the normal and Alzheimer brain. *Neurobiol. Dis.* 9, 88–93 (2002).
- MISRA, P. & FRIDOVICH, I. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247, 3170-3175.
- Mohapatra, S., et al. 2012. Fenvalerate induced stress mitigation by dietary supplementation of multi-species probiotic mixture in a tropical freshwater fish, *Labeo rohita* (Hamilton). *Pest. Biochem. Physiol.* 104. 28-37.
- Monteiro, D., Rantin, F., Kalinin, A., 2009. The effects of selenium on oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish matrinxã, *Brycon cephalus* (Gunther, 1869) exposed to organophosphate insecticide Folisuper 600 BR (methyl parathion). *Comp. Biochem. Physiol. C* 149, 40-49.
- Narra, M., R. 2015. Review: Single and cartel effect of pesticides on biochemical and haematological status of *Clarias batrachus*: A long-term monitoring. *Chemosphere. C* 144. 966-974
- Nimmo, D. R. Em *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Methods and Application*; Rand, G. M.; Petrocelli, S. R., eds.; Hemisphere Publishing Corporation: Washington, 1985.
- Nimmo, D. R. Pesticides. In: Rand, G. M.; Petrocelli, S.R., eds. *Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications*, New York: Hemisphere, p. 335-373, 1985
- Oga, S.; Camargo, M.M. A.; Batistuzzo, J.A.O. *Fundamentos de Toxicologia*. Atheneu Editora São Paulo, São Paulo, 2008, 667 p.
- Ohkawa, H., Ohishi, N. e Andyagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351-358 (1979).
- OPERADOR NACIONAL DO SISTEMA ELÉTRICO. Volume dos principais reservatórios: Luiz Gonzaga. Disponível em: http://www.ons.org.br/historico/percentual_volume_util_out.aspx. Acesso em: 15 Jun. ONS, 2016.
- Pérez-Maldonado, I. N.; Herrera, C.; Batresa L. E.; González-Amaro, R.; Díaz-Barriga, F.; Yáñez, L. DDT-induced oxidative damage in human blood mononuclear cells. *Environ. Res.*, 98, 177-184, 2005.
- Pinheiro, M.C.N.; Macchi, B.M.; Vieira, J.L.F.; Oikawa, T.; Amoras, W.W.; Guimaraes, G.A.; Costa, C.A.; Crespo-López, M.E.; Herculanob, A.M.; Silveira, L.C.L. Nascimento, J.L.M. Mercury exposure and antioxidant defenses in women: A comparative study in the Amazon. *Environ. Res.*, 107, 53-59, 2008.

Rocha, B.C.G.; Vital, T. A piscicultura em tanque-rede no município de Petrolândia-PE: Um arranjo produtivo local em construção. *Revista em Agronegócios e Meio Ambiente*, v.5, n.3, p.475-492, set/dez 2012

Rodríguez-Fuentes, G.; Armstrong, J.; Schlenk, D. Characterization of muscle cholinesterases from two demersal flatfish collected near a municipal wastewater outfall in Southern California. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 69, p. 466–471. 2008.

_____. Characterization of cholinesterase activity from different tissues of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Marine Environmental Research*, v. 58, p. 505-509, 2004.

_____. Environmental monitoring using acetylcholinesterase inhibition in vitro. A case study in two Mexican lagoons. *Marine Environmental Research*, v. 50, p. 357-360, 2000

Scott, Parry. Re-assentamento: saúde e insegurança em Itaparica: um modelo de vulnerabilidade em projetos de desenvolvimento: *Saúde e Sociedade*. 15, 0104-1290, 74-89, 2006

Sedmak, J. J.; GROSSBERG, S. E. A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. *Analytical Biochemistry*, 79: 544-552, 1977.

Senger, M. R.; Rosemberg, D. B.; Rico, E. P.; Arizi, M. B.; DIAS, R. D.; Bogo, M. R.; Bonan, C. D. In vitro effect of zinc and cadmium on acetylcholinesterase and ectonucleotidase activities in zebrafish (*Danio rerio*) brain. *Toxicology in Vitro*, v. 20, p. 954–958, 2006.

Setti, A. A. Diagnóstico sobre a situação dos mananciais dos 20 municípios selecionados dos Estados do Acre, Pará, Ceará, Pernambuco, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Paraná, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul e Goiás e Proposta de Estruturação do Programa de Preservação e Conservação de Mananciais. Relatório Técnico: PNMA, Contrato nº96/9596, 1998. 383p.

Silva, K.C.C.; Assis, C. R. D.; Oliveira, V. M.; Carvalho JR, L. B.; Bezerra, R. S. Kinetic and physicochemical properties of brain acetylcholinesterase from the peacock bass (*Cichla ocellaris*) and in vitro effect of pesticides and metal ions. *Aquatic Toxicology*, Amsterdã, v. 126, p. 191-197, jan. 2013

Single and Carte. 2016. Effect of pesticides on biochemical and

Sobral, M D.; CARVALHO, R. M. C. M. O., SILVA, M. M. da. MELO, G. L.; 2006. Uso e ocupação dos solos no entorno de reservatórios no semi-árido brasileiro como fator determinante da qualidade da água. In: Congresso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Punta del Leste, Anais.

Sobral, M. C. M. Estratégia de gestão dos recursos hídricos no semiárido brasileiro. *Revista Eletrônica do Prodepa*, Fortaleza, v.7, n.2, p. 76-82, nov. 2011.

Sobral, M. C. M.; Carvalho, R. M. C. M. de O, Melo, G. L. LOBO, L. L. Evaluation of environmental impacts of irrigated agriculture in the semi-arid of northeast Brazil, 2007

Sobral, M. C.; Carvalho, R. M. C. M. O.; Figueiredo, R. de C. B. Environmental risk management from multiple use of reservoirs. In: *Reservoirs and River Basins Management: Exchange of Experience from Brazil, Portugal and Germany, 2007*, Berlin. Anais... Berlim: Technische Universität, Berlin, 2007

Songa, E.A; Jonathan, O.O. recent approaches to improving selectivity and sensitivity of enzyme-based biosensors for organophosphorus pesticides: a review. *talanta* 155 (2016) 289-304

Soreq, H., Seidman, S. Acetylcholinesterase – news roles for an old actor. *Nat Rev Neurosci.* (2): 294-302, 2001.

Stegeman, J.J; Brouwer, M.; DI Giulio, R.T.; Förlin, L.; Fowler, B.A.; Sanders, B.M.; VAN VELD, P.A. 1992. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: HUGGET, R.J.;

Sturm, A.; da Silva de Assis, H. C.; Hansen, P. D. Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potential use in the monitoring of neurotoxic contamination. *Marine Environmental Research*, v. 47, p. 389-398, 1999.

Toni, C. et al. Oxidative stress biomarkers in *Cyprinus carpio* exposed to commercial herbicide bispyribac-sodium. *Journal of Applied Toxicology*, v.30, p.590-595, 2010. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jat.1530/pdf>>. Acesso em: 22 set. 2015. doi: 10.1002/jat.1530

Tuovinen, K., Kaliste-Korhonen, E., Raushel, F. M., and Hanninen, O. (1999) Success of pyridostigmine, physostigmine, eptastigmine and phosphotriesterase treatments in acute sarin intoxication. *Toxicology* 134, 169 – 178 Stoichiometric and Catalytic Scavengers as Protection against Nerve Agent Toxicity (PDF Download Available). Available from: https://www.researchgate.net/publication/295704438_Stoichiometric_and_Catalytic_Scavengers_as_Protection_against_Nerve_Agent_Toxicity [accessed Jan 14 2016].

Yonar, M.E.; SAKIN, F. Ameliorative effect of lycopene on antioxidant status in *Cyprinus carpio* during pyrethroid deltamethrin exposure. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v.99, p.226-231, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2010.12.008>>. Acesso em: 13 abr. 2014. doi: 10.1016/j.pestbp.2010.12.008.

4 CONCLUSÃO

O presente trabalho revelou efeitos deletérios sobre marcadores bioquímicos e de genotoxicidade de *Cichla ocellaris* causados por poluentes oriundos dos projetos de irrigação, mesmo em baixas concentrações. As metodologias utilizadas mostraram-se eficazes para estimar a dinâmica dos contaminantes que ocorrem no lago de Itaparica, sob influência das peculiares características de cada área amostrada. A presença de tais efeitos deletérios foi evidenciada principalmente no Projeto Icó-Mandantes, o qual recebe água do riacho Mandantes, integrante do Eixo Leste das obras do Projeto de Integração do rio São Francisco. Sendo assim, o projeto Icó-Mandantes pode ser um dispersor de poluentes, para as demais regiões, sugerindo um risco ambiental para esta e outras espécies que estarão integradas na água oriunda desta localidade, bem como para a população que utilizará a água.

Neste estudo, foi demonstrado que *C. ocellaris* é um organismo promissor como modelo para monitorização *in situ*, através da avaliação dos níveis de genotoxicidade e efeitos bioquímicos, por contaminação ambiental, podendo ser útil em futuros trabalhos de biomonitoramento de outros reservatórios. Os riscos provenientes dos usos da água e do solo em torno do reservatório reforçam a necessidade de contínuo monitoramento como ferramenta de gestão da área.

REFERÊNCIAS

- ADAM, M. L., et al. Environmental degradation at a public park in Southern Brazil as revealed through a genotoxicity test (MN) on peripheral blood cells from *Poecilia vivipara* (Teleostei). **Water, Air, and Soil Pollution**, 211, 61–68, 2010.
- AHMAD, I.; MARIA, V. L.; OLIVEIRA, M.; PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Modulatory role of copper on α -naphthoflavone-induced DNA damage in European eel (*Anguilla Anguilla* L.). **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, 71: 886-812, 2008.
- ALDRIDGE, W. N. Some properties of specific cholinesterase with particular reference to mechanism of inhibition by diethyl p-nitrophenyl thiophosphate (E605) and analogues. **Biochemical Journal**, 46, p. 117–124, 1950.
- ALMEIDA, J. R.; OLIVEIRA, C.; GRAVATO, C.; GUILHERMINO, L. Linking behavioural alterations with biomarkers responses in the European seabass *Dicentrarchus labrax* L. exposed to the organophosphate pesticide fenitrothion. **Ecotoxicology**, v. 19, p. 1369–1381, 2010.
- AL-SABTI K, Metcalfe C. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**. 343:121-135, 1995.
- ALSCHER, R. G.; ERTURK, N.; HEATH, J. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 372, p. 1331 – 1341, 2002.
- AMARANENI, S.R. & PILLALA R.R. Concentrations of pesticide residues in tissues of fish from Kolleru Lake in India. **Environ. Toxicol.**, v.16, n.6, p.550-556, 2001.
- AN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 13: 57-149, 2003.
- ANWAR, W. A. Biomarkers of human exposure to pesticides. **Environmental Health Perspectives**. v. 105, suppl. 4, p. 801-806, 1997
- ARALDI, R.P.; et al. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: a review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 72, p. 74-82, 2015.
- ASSIS, C. R. D.; AMARAL, I. P. G.; CASTRO, P. F.; CARVALHO Jr., L., B.; BEZERRA, R. S. Effect of dichlorvos on the acetylcholinesterase from tambaqui (*Colossoma macropomum*) brain. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 26, N. 7, p. 1451–1453. 2007.
- ASSIS, C.R.D. et al. Characterization of catalytic efficiency parameters of brain cholinesterases in tropical fish. **Fish Physiol Biochem.**, 2014.

- ASSIS, C.R.D., BEZERRA, R.S., CARVALHO Jr., L.B. Fish cholinesterases as biomarkers of organophosphorus and carbamate pesticides. In: **Pesticides in modern world – Book 5**. Stoytcheva, M. (Ed). Intech, Rijeka, Croatia, 2011
- ASSIS, C.R.D., et al. Characterization of acetylcholinesterase from the brain of the Amazonian tambaqui (*Colossoma macropomum*) and in vitro effect of organophosphorus and carbamate pesticides. **Environmental Toxicology and Chemistry**. 29, 2243–2248, 2010.
- ATSDR. AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Case studies in Environmental Medicine cholinesterase inhibitors: including pesticides and chemical warfare nerve agents**. Course WB1102. Disponível em: <http://www.atsdr.cdc.gov/csem/csem.html>. Atlanta, 153 p., 2007.
- ATSDR. AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Toxicologic information about insecticides used for eradicating mosquitoes (West Nile virus control)**. Atlanta, 2005.
- BAKER, R. C.; KRAMER, R. E. Cytotoxicity of short-chain alcohols. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, 39: 127-150, 1999.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, 29: 113-123. 2006
- BARSIENE, J. et al. Analysis of micronuclei in blue mussels and fish from the Baltic and North Seas. **Environ. Toxicol.** 19, 365–371, 2004.
- BEAUVAIS, S. L.; COLE, K. J.; ATCHISON, G. J.; COFFEY, M. Factors affecting brain cholinesterase activity in Bluegill (*Lepomis macrochirus*). **Water, Air, and Soil Pollution**, 135, p. 249–264, 2002.
- BERG, J. M; STRYER, L.; TYMOCZKO, J. L. **Bioquímica**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,. 1104 p, 2004.
- BETTERIDGE, D. J. **What is oxidative stress? Metabolism**, v. 49, p. 3-8, 2000.
- BOCQUENÉ, G.; GALGANI, F.; TRUQUET, P. Characterization and assay conditions for use of AChE activity from several marine species in pollution monitoring. **Marine Environmental Research**, v. 30, p. 75-89, 1990
- BOLOGNESI, C., Perrone, E., Roggieri, P. & Sciutto, A. Bioindicators in monitoring long term genotoxic impact of spill: Haven case study. **Mar. Environ. Res** 65, S287–S291, 2006.
- BOLOGNESI, C.; LANDINI, E.; ROGGIERI, P.; FABBRI, R. & VIARENGO, A. Genotoxicity biomarkers in the assessment of heavy metal effects in mussels: Experimental studies. **Env. Mol. Mutag.**, 33: 287 - 292, 1999.
- BONSALL, J. L.; GOOSE, J. The safety evaluation of bendiocarb, a residual insecticide for vector control. **Toxicology Letters**. v. 33, p. 45-59, 1986.
- BRASIL. Conselho Nacional de Meio Ambiente. Resolução no 302/2002. Brasília, 2004.

BRASIL. **Lei Federal nº 7.802 de 11/07/89**. Dispõe sobre o tratamento de embalagens e resíduos de agrotóxicos e dá outros tratamentos. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L9974.htm> Acesso em: 20 de janeiro de 2012.

BÜCKER, A.; CARVALHO, W.; ALVES-GOMES, J. A. Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. **Acta Amazon.**, 36: 357-364, 2006.

CAIRNS, J.Jr., PRATT, J.R. A history of biological monitoring using benthic macroinvertebrates. In: ROSENBERG, D.M, RESH, V.H. Freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates. **New York: Chapman & Hall**; p. 10-27. 1993.

CALDAS, L.Q. de A.; 2000 Centro de Controle de Intoxicações. **Intoxicações Exógenas Agudas por Carbamatos, Organofosforados, Compostos Bipiridílicos e Piretróides**. Niterói-RJ. Disponível em <<http://www.uff.br/ccin/>>. Acessado em 10/09/2011.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M. S. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects **Can. J. Fish Aquat. Sci.**, 47: 2123-2136, 1990.

CASARETT, L. J.; KLASSEN, L.; DOULLS, P. Toxicology: the basic science of poisons. 5th ed. **New York: McGraw-Hill**, 768 p., 1996.

CHANDRASEKARA, H. U.; PATHIRATNE, A. Influence of low concentrations of Trichlorfon on haematological parameters and brain acetylcholinesterase activity in common carp, *Cyprinus carpio* L. **Aquaculture Research**, 36, p. 144-149, 2005.

CHRISTOFOLETTI, C. A. **Avaliação dos potenciais citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas de um ambiente lântico, por meio dos sistemas-teste de *allium cepa* e *oreochromis niloticus***. (Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista). p.129. Rio Claro, 2008.

CODEVASF - Companhia De Desenvolvimento Dos Vales Do São Francisco E Do Parnaíba. **Apolônio Sales: Produção Agrícola/Características da produção**. Disponível em: <<http://www.codevasf.gov.br/principal/perimetros-irrigados/elenco-de-projetos/apolonio-sales>>. Acesso em: 24/04/2015.

CODEVASF - Companhia De Desenvolvimento Dos Vales Do São Francisco E Do Parnaíba. **Desenvolvimento territorial e arranjos produtivos no Lago de Itaparica**. Disponível em: <http://www.codevasf.gov.br/programas_acoes/desenvolvimento-territorial/arranjos-produtivos-locais/arranjo-produtivo-de-aqueicultura-do-lago-de-itaparica> Acesso em: 23/09/2011.

CONDEPE/FIDEM – Agência Estadual de Planejamento e Pesquisas de Pernambuco. **Diagnóstico sócio, econômico, político e cultural de PetrolândiaPE**, 2001.

ECOBICHON, D. J. Toxic effects of pesticides. In: AMDUR, M. O.; DOULL, J.; KLASSEN, C. D., editores. Casarett and Doll's toxicology: the basic science of poisons. 4. ed. Nova York: **Mc Graw Hill**; 1993. p. 565-622.

ECOBICHON, D. J. Toxic Effects of Pesticides. In: CASARETT, L. J.; KLASSEN, L.; DOULLS, P. Toxicology – The Basic Science of Poisons. 5 ed.: **McGraw-Hill**. p. 763-810, 1996.

FAO. Pesticides in food report 2007.

FAO. Plant production and protection paper. **Food and Agriculture Organization, Rome, IT**. 2007

GOTTI, C., CLEMENTI, F. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. **Prog Neurobiol.** (74): 363-396, 2004.

GOULART, M. & CALLISTO, M. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. **Revista da FAPAM**, ano 2, n. 1, 2003

HE, F. Biological monitoring of occupational pesticides exposure. **International Archives of Occupational & Environmental Health**. v. 65, p. 569-576. 1993.

HEEREN, G.A., TYLER, J. & MANDEYA, A. **Agricultural chemical exposures and birth defects in the Eastern cape province , South Africa a case – control study**. Environmental Health: A Global Access Science Source 2: 11. 2003

IBAMA. INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. GEO Brazil 2002. **Brazil Environment Outlook**. Brasília, 2002.

JAGA, K. et al. What are the implications of the interaction between ddt and estrogen receptors in the body?. **Medical Hypotheses** 54:18-25. 2000

JARRARD, H. E.; DELANEY, K. R.; KENNEDY, C. J. Impacts of carbamate pesticides on olfactory neurophysiology and cholinesterase activity in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **Aquatic Toxicology**, 69, p. 133–148, 2004.

JEYARATNAM, J.; MARONI, M. Organophosphorus compounds. **Toxicology**. v. 91, p. 15-27, 1994.

KAPPUS, H. A survey of chemicals inducing lipid peroxidation in biological systems. **Chemistry and Physics of Lipids**, 45: 105-115, 1987.

KEIZER, J.; D'AGOSTINO, G.; NAGEL, R.; VOLPE, T.; GNEMID, P.; VITOZZI, L. Enzymological differences of AChE and diazinon hepatic metabolism: correlation of in vitro data with the selective toxicity of diazinon to fish species. *Science of the Total Environment*, v. 171, p. 213-220, 1995.

KELLAR, K. J. Overcoming inhibitions. *Proceedings of The National Academy of Sciences*. v. 103, p. 13263–13264, 2006.

- KELLY, K. A.; HAVRILLA, C. M.; BRADY, T. C.; ABRAMO, K. H.; LEVIN, E. D. Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems. *Environmental Health Perspectives*, 106 (7): 375-384, 1998
- KIM, I. Y.; HYUN, C. K. Comparative evaluation of the alkaline comet assay with the micronucleus test for genotoxicity monitoring using aquatic organisms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 64: 288-297, 2006
- KUMAR, R.; NAGPURE, N. S.; KUSHWAHA, B. SRIVASTAVA, S. K.; LAKRA, W. S. Investigation of the genotoxicity of Malathion to freshwater teleost fish *Channa punctatus* (Bloch) using the micronucleus test and comet assay. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 58: 123-130, 2010
- LANSAC-TÔHA, F. A.; VELHO, L. F. M.; BONECKER, C. C.; 1999. Estrutura da Comunidade Zooplancônica Antes e Após a Formatação do reservatório de Corumbá-GO IN: Ecologia de reservatórios: Estrutura, função e Aspectos sociais (Ed. Henry, R.), FABESP, São Paulo.
- LARINI, L. Toxicologia dos Inseticidas. p. 57-86, Sarvier, São Paulo; 1979. 281 p.
- LARINI, L. Toxicologia dos Praguicidas. São Paulo: Editora Manole, 1999.
- LEE, R. F.; STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutation Research**, 544: 43-64, 2003
- LIVINGSTONE, D. R. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 120: 43-49, 1998
- MACHEMER, L.H.; PICKEL, M. Carbamates Insecticides. **Toxicology**. v. 91, p. 29-36, 1994.
- MEAGHER, E. A.; FITZGERALD, G. A. Indices of lipid peroxidation in vivo: Strengths and limitation. **Free Radical Biology & Medicine**, 28 (12): 1745-1750, 2000.
- MELO, G. L. **Estudo da qualidade da água no reservatório de Itaparica localizado na bacia do rio São Francisco**. Recife,. (Dissertação de Mestrado –Universidade Federal dePernambuco. Programa de Pós Graduação em Engenharia Civil). p. 15-16, 2006
- MOREIRA, J. C. et al. Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ. **Ciência Saúde Coletiva**;7(2):299-311. 2002
- MUKHERJEE, I.; GOPAL, M. Organochlorine insecticide residues in drinking and groundwater in and around Delhi. **Environmental Monitoring and Assessment**, 76, p. 185–193, 2002.

MUTCH, E.; BLAIN, P. G.; WILLIAMS, F. M. Interindividual variations in enzymes controlling organophosphate toxicity in man. **Human & Experimental Toxicology**, v. 11, p. 109-116, 1992.

NAUEN, R.; BRETSCHNEIDER, T. New modes of action of insecticides. **Pesticide Outlook**, 13, 241-245, 2002.

NIMMO, D. R. Pesticides. In: RAND, G. M.; PETROCELLI, S.R., eds. Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications, **New York: Hemisphere**, p. 335-373, 1985.

NUNES, M. V.; TAJARA, E. H. Efeitos tardios dos praguicidas organoclorados no homem. **Revista de Saúde Pública**, 3, 4, p. 372-383, 1998.

O'MALLEY, M. Clinical evaluation of pesticide exposure and poisonings. **Lancet**, v. 349, p. 1161-1166, 1997.

PEROCCO, P. et al. Cytotoxic and cell transforming activities of the fungicide emethyl thiophana teon BALBRC 3T3 cells in vitro. **Mutation Research** 394:29-35. 1997

QUINN, D. M. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. **Chemical Reviews**, 87, p. 955-979, 1987.

RODRÍGUEZ-FUENTES, G.; ARMSTRONG, J.; SCHLENK, D. Characterization of muscle cholinesterases from two demersal flatfish collected near a municipal wastewater outfall in Southern California. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 69, p. 466–471. 2008.

RODRÍGUEZ-FUENTES, G.; GOLD-BOUCHOT, G. Environmental monitoring using acetylcholinesterase inhibition in vitro. A case study in two Mexican lagoons. **Marine Environmental Research**, v. 50, p. 357-360, 2000.

ROJAS R., A.; OJEDA B., M. E.; BARRAZA O., Ximena. Malformaciones congénitas y exposición a pesticidas. **Revista Médica de Chile**, v. 128, n. 4, p. 399-404, 2000.

SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, J. C.; MORENO-SÁNCHEZ, B. Lizard cholinesterases as biomarkers of pesticide exposure: enzymological characterization. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 21, p. 2319-2325, 2002.

SAYED, I.; PARVEZ, S.; PANDEY, S.; BIN-HAFEEZ, B.; HAQUE, R.; RAISUDDIN, S. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 56 (2): 295-301, 2003.

SCHEWE, T.; RAPOPORT, S. M.; KÜHN, H. Enzymology and physiology of reticulocyte lipoxygenase: comparison with other lipoxygenases. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, 58: 191-272, 1986.

SCOTT, G. R.; SLOMAN, K. A. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. **Aquatic Toxicology**, 68, p. 369–392, 2004.

SEVANIAN, A.; URSINI, F. Lipid peroxidation in membranes and low density lipoproteins: similarities and differences. **Free Radical Biology & Medicine**, 29: 306-311, 2000.

SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L. Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. **Current Opinion in Pharmacology**, 5, p. 293–302, 2005.

SILVA, J.W.B.; CHACON, J.O.; SANTOS, E.P. Curva de rendimento do Tucunaré pinima *Cichla temensis* (Humboldt, 1833), do açude público “Estevam Marinho” (Curemas, Paraíba, Brasil) (Pisces, actinopterygii Cichlidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v.40, p.203-206, 1980.

SMITH, J. D., BAGG, J., WRIGLEY, I. Extractable polycyclic hydrocarbons in water from rivers in southeastern Australia. **Water Research**, 25: 1145-1150, 1991.

SOBRAL, M D.; CARVALHO, R. M. C. M. O., SILVA, M. M. da. MELO, G. L.;. **Uso e ocupação dos solos no entorno de reservatórios no semi-árido brasileiro como fator determinante da qualidade da água**. In: Congresso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Punta del Leste, Anais. 2006

STURM, A.; DA SILVA DE ASSIS, H. C.; HANSEN, P. Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potential use in the monitoring of neurotoxic contamination. **Marine Environmental Research**, 47, 389–398, 1999.

SUNGUR, M. & GÜVEN, M.I.. Intensive care management of organophosphate insecticide poisoning. **Critical Care** 5:211-215. 2001

TAYLOR, P.; RADIC, Z.; HOSEA, N. A.; CAMP, S.; MARCHOT, P. BERMAN, H. A. Structural basis for the specificity of cholinesterase catalysis and inhibition. **Toxicology Letters**, 82/83, p. 453-458. 1995.

TÔUGU, V. **Acetylcholinesterase: mechanism of catalysis and inhibition**. **Current Medicinal Chemistry - Central Nervous System Agents**, 1, p. 155-170, 2001.

TUNDISI, J.G.; 2003. **A água no século XXI: enfrentando a escassez**. São Carlos: RIMA, 2003. p.256.

UFF/CCIn. UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE/CENTRO DE CONTROLE DE INTOXICAÇÕES. **Intoxicações Exógenas Agudas por Carbamatos, Organofosforados, Compostos Bipiridílicos e Piretróides**, Niterói: UFF, 2000.

USDA/USEPA/ATSDR. U. S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE/U. S. ENVIRONMENT PROTECTION AGENCY/AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. Toxicological Profile for DDT, DDE and DDD. Toxicological Profile 35. **Atlanta**, 2002.

VALAVANIDIS, A.; VLAHOIANNI, T.; DASSENAKIS, M.; SCOULLOS, M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 64: 178-189, 2006.

WAICHMAN, A.V.; Uma proposta de avaliação integrada de risco do uso de agrotóxicos no estado do Amazonas, Brasil. **Acta Amazônica**.vol. 38(1) 2008: 45 – 51. 2008

WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification: The WHO recommended classification of pesticides by hazard. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 2006., v. 19, p. 22-37, 2004.

WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification: 2004. The WHO recommended classification of pesticides by hazard. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 2006., v. 19, p. 22-37, 2004.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Organophosphorus insecticides: a general introduction. **Environmental Health Criteria** 63, Geneva, 1990.

WHO/UNEP/ILO/IPCS. The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification: 2004. The WHO recommended classification of pesticides by hazard. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 2006.

YOUNES, M & Galal-Gorchev, H. Pesticides in drinking water – a case study. **Food Chem Toxicol.**, v.38; p.S87-S90, 2000.

ZHOU, Q.; et al.; Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. **Analytica chimica acta**, v.606, p.135–150, 2008.

APÊNDICE A - ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA AQUATIC TOXICOLOGY**ISSN:0166-44**

Kinetic and physicochemical properties of brain acetylcholinesterase from the peacock bass (*Cichla ocellaris*) and *in vitro* effect of pesticides and metal ions

Kaline Catiely Campos Silva, Caio Rodrigo Dias Assis, Vagne Melo Oliveira, Luiz Bezerra Carvalho Jr and Ranilson Souza Bezerra*

Departamento de Bioquímica and Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brazil.

Abstract

Brain acetylcholinesterase (AChE; EC 3.1.1.7) from peacock bass (*Cichla ocellaris*) was characterized and its activity was *in vitro* assayed in the presence of seven pesticides (five organophosphates: dichlorvos, diazinon, chlorpyrifos, temephos, tetraethyl pyrophosphate - TEPP and two carbamates: carbaryl and carbofuran) and fourteen metal ions (Al^{3+} ; As^{3+} ; Ba^{2+} ; Ca^{2+} ; Cd^{2+} ; Cu^{2+} ; Fe^{2+} ; Hg^{2+} ; K^{+} ; Li^{+} ; Mg^{2+} ; Mn^{2+} ; Pb^{2+} ; Zn^{2+}) and EDTA^{2-} . The kinetic parameters K_m and V_{max} were determined as 0.769 mM and 0.189 U/mg protein, respectively. Selective inhibitors such as BW284c51, Iso-OMPA, neostigmine and eserine have confirmed AChE as responsible for the analyzed activity. Optimum pH was found to be 8.0 and optimum temperature was 45°C. The enzyme retained approximately 45 % of the activity after incubation at 50°C for 30 min. All the employed pesticides showed inhibitory effects on *C. ocellaris* AChE. However, the strongest effects were observed with carbofuran ($\text{IC}_{50} = 0.21 \mu\text{M}$ and $\text{Ki} = 2.57 \times 10^{-3} \mu\text{M}$). The enzyme was inhibited by As^{3+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} and Zn^{2+} whereas its activity was resistant to EDTA until at least 10 mM. The present study provides assay conditions and data about AChE from *C. ocellaris* in relation to its use as *in vitro* biomarker of organophosphorus and carbamate pesticide in routine environmental screening programs.

Key words: organophosphorus, carbamates, acetylcholinesterase, biomarkers, *Cichla ocellaris*

1. Introduction

Organophosphate (OP) and carbamate (CB) compounds are the most widely used insecticides in the world. In 2007, only OPs accounted for 35% of all insecticides used in the United States (USEPA, 2011).

OP and CB toxicity lies in an inhibitory action on cholinesterases enzymes such as acetylcholinesterase (AChE; EC 3.1.1.7) that participates in neuronal communication in most invertebrates and vertebrates, through the hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine in the synaptic cleft (Quinn, 1987) and butyrylcholinesterase (BChE; EC 3.1.1.8) whose physiological function are not elucidated and is commonly considered a detoxifying enzyme (Soreq and Zakut, 1990; Çokugras, 2003; Nicolet *et al.*, 2003).

This inhibitory action results in the accumulation of acetylcholine in the synapses of the central nervous system, neuromuscular junctions, sympathetic and parasympathetic nerve endings (Tõugu, 2001). This inhibition is a specific reaction, considered the main effect of exposure to organophosphorus pesticides (Taylor *et al.*, 1995) and carbamates (Jarrard *et al.*, 2004). Their mechanism of action occurs by strong interaction with the esteratic site of AChE, preventing the binding of the substrate through virtual irreversible phosphorylation for OP and reversible carbamoylation in the case of CB (Quinn, 1987).

AChE has been also used for monitoring these pesticides and other compounds *in vivo* (Antwi, 1987; Rendón-von Osten *et al.*, 2005) and *in vitro* (Beauvais *et al.*, 2002; Shaoguo *et al.*, 2003; Rodríguez-Fuentes and Gold-Bouchot, 2004). The investigation of AChE inhibitors is relevant to identify the usefulness of this enzyme as a tool in environmental and food monitoring (Fairbrother and Bennett, 1988; Bocquené *et al.*, 1990; Payne *et al.*, 1996;

Rodríguez-Fuentes and Gold-Bouchot, 2004; Rodríguez-Fuentes *et al.*, 2008). Monitoring pesticides at biochemical level can specifically detect the presence of contaminants in the environment before they reach higher organizational levels (Monserrat *et al.*, 2003).

Studies using fish such as Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Rodríguez-Fuentes and Gold-Bouchot, 2000), the North-American centrarchid Bluegill, *Lepomis macrochirus* (Beauvais *et al.*, 2002), the silver salmon *Oncorhynchus kisutch* (Jarrard *et al.*, 2004), common carp *Cyprinus carpio* (Chandrasekara and Pathiratne, 2005) and correlation between behavioral and physiological changes in indicators of several species (Scott and Sloman, 2004) have confirmed fish as a practical and economically viable source of acetylcholinesterase, able to make routine procedures for biomonitoring water resources (Bocquené, Galgani and Truquet, 1990). The species chosen in this work was the peacock bass (*Cichla ocellaris*) which is an important native fish. Originally from the Amazon basin (artificially dispersed in several basins of South America) and presenting carnivorous feeding habits, it has demonstrated considerable efficiency in controlling invasive fish in reservoirs. These features, coupled with the excellent quality of its meat, make this species an alternative of high potential to be used in intensive fish farming in the future.

There is still a big gap to be filled for the diagnosis of aquatic environments contaminated by pesticides and, in addition to this fact, there are different results reported in the literature as the correlations between concentrations of pesticides used and the resulting inhibition rates. This study aims to investigate physicochemical and kinetic properties of the brain AChE from *C. ocellaris* as well as its behavior in presence of anticholinesterasic pesticides and metal ions in order to identify it as a possible tool for use in environmental monitoring.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Acetylthiocholine iodide, S-butyrylthiocholine iodide, tetraisopropyl pyrophosphoramidate (Iso-OMPA), 1,5-bis(4-allyldimethylammoniumphenyl) pentan-3-one dibromide (BW284c51), neostigmine bromide, eserine, bovine serum albumin, 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic) acid (DTNB), tris (hydroxymethyl) aminomethane, dimethyl sulfoxide (DMSO) and magnesium sulphate were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Analytical grade dichlorvos (98.8%), diazinon (99.0%), chlorpyrifos (99.5%), temephos (97.5%), TEPP (97.4%) (Tetraethyl pyrophosphate), carbofuran (99.9%) and carbaryl (99.8%) were obtained from Riedel-de-Haën, Pestanal[®] (Seelze, Germany). The other reagents were of analytical grade. The juvenile (sub-adults) specimens of *C. ocellaris* (31.17 ± 2.47 cm; 322 ± 14.28 g) were captured in São Francisco River, near the city of Petrolândia, Pernambuco State, Brazil.

2.2. Methods

2.2.1. Enzyme extraction

The fishes were sacrificed in an ice bath (0°C). The brains were immediately removed, pooled and homogenized (tissue disrupter IKA RW-20 digital, Staufen, Germany) in 0.5 M Tris-HCl buffer, pH 8.0, until reach a ratio of 20 mg of tissue per mL of buffer. The homogenates were centrifuged for 10 min at $1,000 \times g$ (4°C) and the supernatants (crude extracts) were frozen at -20°C for further assays.

2.2.2. Enzyme activity and protein determination.

Enzyme activity was performed according to Assis *et al.* (2010) as follows: 0.25 mM DTNB (200 µL) prepared in 0.5 M Tris-HCl buffer pH 7.4 was added to the crude extract (20 µL), and the reaction started by the addition of 62 mM of acetylthiocholine or S-

butyrylthiocholine iodide (20 μ L). Enzyme activity was determined by following the absorbance increase at 405 nm for 180 s using a microplate spectrophotometer Bio-Rad xMark™ (Hercules, CA, USA). A unit of activity (U) was defined as the amount of enzyme capable of converting 1 μ M of substrate per minute. The blanks were prepared with the buffer instead of crude extract sample. Protein content was estimated according to Sedmak and Grossberg (1978), using bovine serum albumin as the standard.

2.2.3. Kinetic parameters

The kinetic parameters Michaelis-Menten constant (K_m) and maximum velocity (V_{max}), were estimated with increasing acetylthiocholine concentrations from 0.8 to 20.8 mM final concentration and fitting to non-linear regression using the software MicroCal™ Origin® Version 8.0 (MicroCal, Northampton, MA, USA).

2.2.4. Optimal pH and temperature

Assays were performed with DTNB solutions in a pH range from 4.0 to 9.0 by using citrate-phosphate (4.0 – 7.5), tris-HCl (7.2 – 9.0) buffers. Substrate non-enzymatic hydrolysis (in alkaline pH) was corrected by subtracting their values from the activities. Optimum temperature was established by assaying the enzyme activity at temperatures ranging from 0 to 80°C for 180 s. Thermal stability of fish AChE was evaluated by exposing crude extract samples for 30 min at temperatures ranging from 25 to 80°C and assaying the remaining activity after 15 minutes at 25°C (room temperature) equilibration.

2.2.5. Selective inhibitors assays

The samples were subjected to selective inhibitors BW284c51 (AChE inhibitor), Iso-OMPA (BChE inhibitor), neostigmine bromide and eserine (total cholinesterases inhibitors) in order to identify which cholinesterases are present in the brain of *C. ocellaris*. The inhibitors were diluted at concentrations from 0.001 to 10 mM with each subsequent concentration 10-fold higher than the previous concentration. They were incubated (10 μ L) with the crude extract (10 μ L) for 1 h. Then, DTNB 0.25 mM were added (200 μ L) and the reaction started with the addition of 62 mM substrate (20 μ L). The absorbance was followed at 405 nm for 180s under the same conditions of 2.2.2. The respective residual activities were determined, considering the absence of inhibitors as 100% activity.

2.2.6. Activity in presence of metal ions

AChE activity was assayed in presence of fifteen ions: Al^{3+} (AlCl_3), Ba^{2+} (BaCl_2), Ca^{2+} (CaCl_2), Cd^{2+} (CdCl_2), Cu^{2+} (CuCl_2 and CuSO_4), Fe^{3+} (FeCl_3), Hg^{2+} (HgCl_2), K^+ (KCl), Li^+ (LiCl), Mg^{2+} (MgSO_4), Mn^{2+} (MnCl_2), As^{3+} (NaAsO_2), Pb^{2+} (PbCl_2 and $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$), Zn^{2+} (ZnCl_2) and the complex chelating ion EDTA^{2-} as $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8$. The ions were diluted to concentrations ranging from 0.001 to 10 mM (excepting EDTA^{2-} up to 150 mM), being each concentration 10-fold higher than the previous one as described for the pesticides. The ions solutions (10 μ L) were incubated with crude extract (10 μ L) for 40 min (Bocquené *et al.*, 1990) at 25°C and the residual activity was determined according to 2.2.2 and 2.2.5. Means $\pm$ standard deviation were compared using ANOVA and Tukey test ($p < 0.05$).

2.2.7. Inhibition assay by pesticides

AChE inhibition assays were carried out using the organophosphates dichlorvos, diazinon, chlorpyrifos, temephos and TEPP and the carbamates carbaryl and carbofuran as

inhibitors. The insecticides were diluted to seven concentrations ranging from 0.001 to 1000 ppm ($\mu\text{g/mL}$). These concentrations respectively corresponded (in μM) to: 0.0045 to 4520 (dichlorvos); 0.0032 to 3280 (diazinon); 0.0028 to 2850 (chlorpyrifos); 0.0021 to 2140 (temephos); 0.0034 to 3450 (TEPP); 0.0061 to 6130 (carbaryl); and 0.0045 to 4520 (carbofuran). The incubation was performed in accordance to Assis *et al.* (2007) and the residual activity was determined according to 2.2.5. All assays were carried out at room temperature (25°C).

2.2.8. Estimation of IC_{50} , IC_{20} and K_i

Data from curves generated in the inhibition assays were statistically analyzed by linear and non-linear regression fitted to sigmoidal (Boltzmann) or exponential decay ($p < 0.05$) modelling using MicroCal™ Origin® Version 8.0. Then, were estimated the IC_{50} and IC_{20} (concentration able to inhibit the enzyme in 50 and 20 % of its activity, respectively) corresponding to each inhibitor, pesticide or ion. These data were required to calculate the inhibition constant (K_i) using the equation of Cheng and Prussoff (1973):

$$K_i = \frac{\text{IC}_{50}}{1 + [\text{S}]/\text{K}_m} \quad , \text{ where } [\text{S}] \text{ corresponds to the substrate}$$

concentration.

3. Results

The kinetic parameters K_m and V_{max} found for *C. ocellaris* were 0.77 mM and 0.189 U/mg protein, respectively using the substrate acetylthiocholine. **Table 1** compares these parameters from several species, where is observed a variation for K_m from 0.1 (*O. niloticus*) to 1.69 mM (*P. Vetulus*) while for V_{max} values ranged from 0.129 (*C. macropomum*) to 0.482 U/mg protein (*P. Vetulus*).

Table 1. Kinetic and catalytic efficiency parameters of brain AChE from *C. ocellaris* and other species.

Species	K_m [mM]	V_{max} [U/mg protein]	References
<i>Cichla ocellaris</i>	0.769 ± 0.27	0.189 ± 0.04	Present work
<i>Colossoma macropomum</i>	0.430 ± 0.02	0.129 ± 0.05	Assis et al., 2010
<i>Oreochromis niloticus</i>	0.10 ± 0.03	0.229 ± 0.014	Rodríguez- Fuentes and Gold- Boucht, 2004
<i>Pleuronectes vetulus</i>	1.69 ± 0.26	0.482 ± 0.034	Rodríguez- Fuentes et al., 2008

- not determined

Optimum pH for *C. ocellaris* enzyme was found to be 8.0 (**Fig. 1A**). These results are close to the values found for some studies showed in **Table 2**.

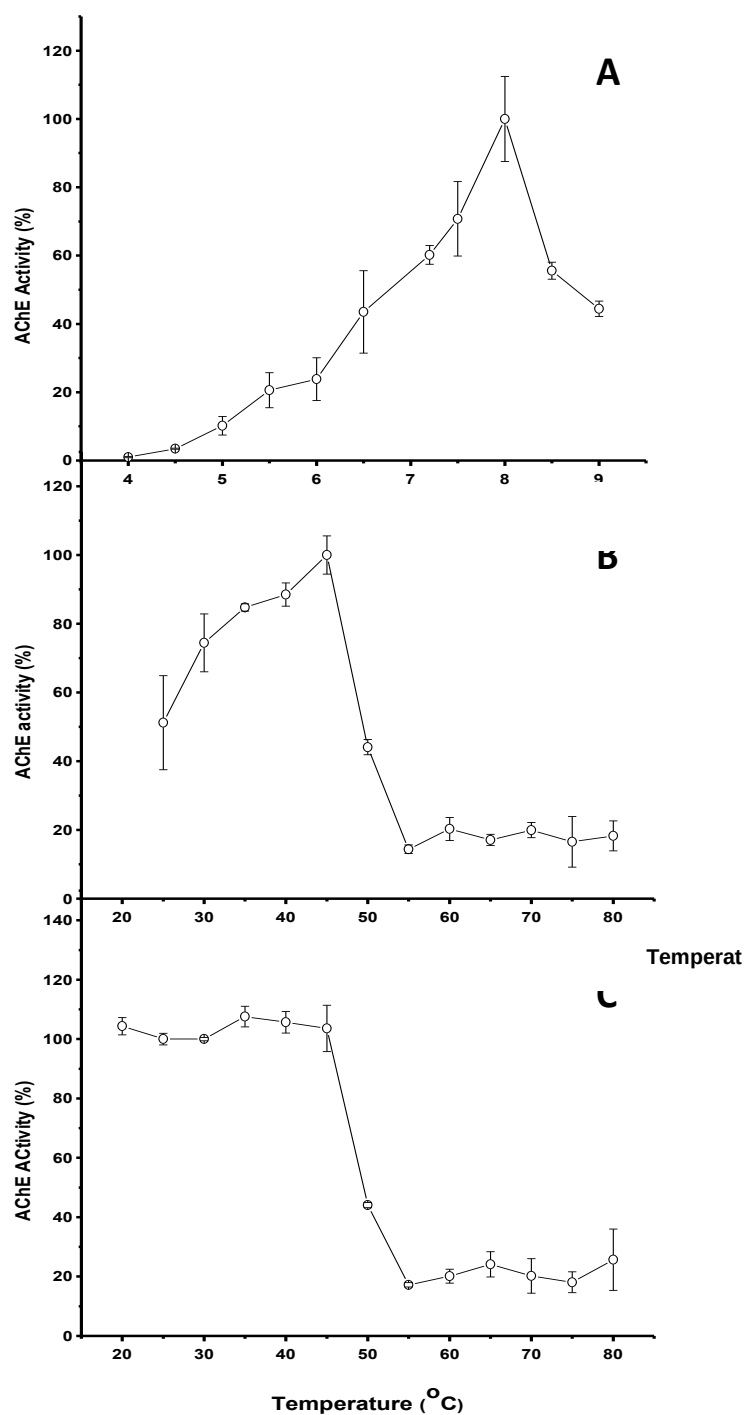


Figure 1 – (A) Effect of pH on the AChE activity from brain of *C. ocellaris*. The pH range was attained by using citrate-HCl, citrate-phosphate and tris-HCl buffers; (B) Effect of temperature on the activity of brain AChE from *C. ocellaris*. The activity was assayed in a

range from 25 to 80°C; (C) AChE thermal stability assayed from 20 to 80°C on the enzyme preparation for 30 min and after 15 min equilibrium at 25°C.

Figure 1B displays the optimum temperature for *C. ocellaris* AChE estimated as 45 °C, the same for *C. macropomum* (**Table 2**). For the same parameter, was found 33 °C for *Pleuronectes platessa*, while 25 and 35°C for *Lepomis macrochirus* and *Carassius auratus*, respectively. The enzyme retained around 45 % of the activity after incubation at 50°C for 30 min and 15 min equilibration in room temperature (**Fig. 1C**).

Table 2. Physicochemical parameters of brain AChE from *C. ocellaris* and other species.

Species	pH optimum	Optimum Temperature [°C]	References
<i>Cichla ocellaris</i>	8.0	45	present work
<i>Colossoma macropomum</i>	7.5-8.0	45	Assis et al., 2010
<i>Lepomis macrochirus</i>	-	25	Beauvais et al., 2002
<i>Solea solea</i>	7,5	-	Bocquene, Galgani e Truquet, 1990
<i>Pleuronectes platessa</i>	8,5	33	Bocquene, Galgani e Truquet, 1990
<i>Scomber scomber</i>	8,0	-	Bocquene, Galgani e Truquet, 1990
<i>Carassius auratus</i>	-	35	Hazel, 1969

- not determined

Figure 2 shows the *C. ocellaris* AChE activity under exposure to selective inhibitors. It can be observed higher residual activity of brain AChE from *C. ocellaris* which retained almost 100% activity even at 10 mM of Iso-OMPA (**Fig. 2A**), while the results for exposition to BW284c51 was a sudden drop in its activity after 0.001 mM of this inhibitor (**Fig. 2B**).

Under neostigmine and eserine exposure, activity decreased sharply at 0.001 mM (**Figs. 2C, 2D**). The IC_{50} and K_i related to each selective inhibitor are presented in **Table 3**.

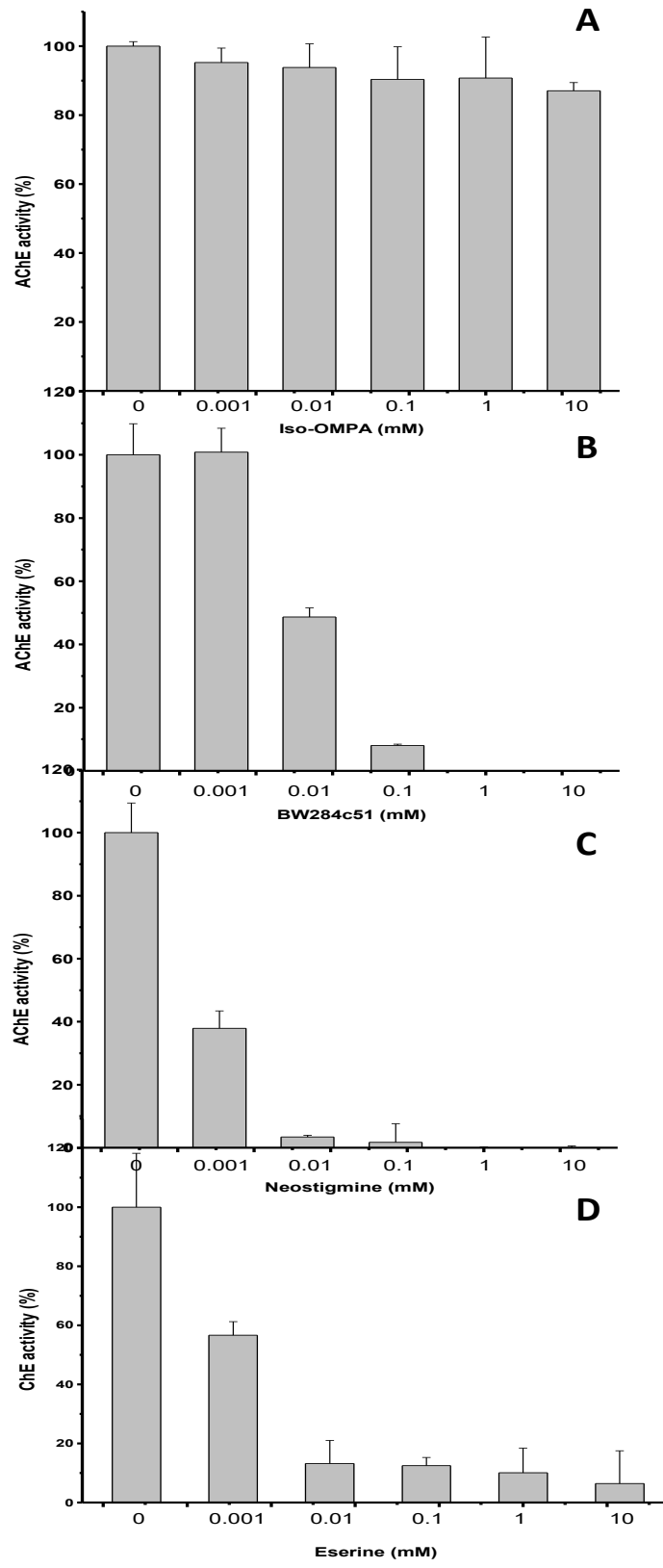


Figure 2 – Activity of *C. ocellaris* brain AChE in presence of increasing concentrations (0-10 mM) of the selective inhibitors: (A) Iso-OMPA; (B) BW284c51; and the total ChEs inhibitors: (C) neostigmine; (D) eserine.

Table 3. IC₅₀ and K_i *in vitro* estimated for *C. ocellaris* in presence of selective inhibitors.

Inhibitor	IC ₅₀ (μM)	K _i (μM)
BW284c51	9.00	0.11
Iso-OMPA	-	-
Neostigmine	0.69	0.0084
Eserine	1.4	0.0172

– No effect

In relation to heavy metals and other ions, ten cations caused no significant effect on enzyme activity in the concentration range until 1 mM: Al³⁺, Ba²⁺, Ca²⁺, Cd²⁺, Fe²⁺, K⁺, Li⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Pb²⁺. EDTA²⁻ also did not affect *C. ocellaris* AChE activity in this concentration. On the other hand, some ions caused inhibition such as As³⁺ (75%), Cu²⁺ (35%), Hg²⁺ (100%) and Zn²⁺ (18%) (**Table 4**). Their IC₅₀ and K_i are displayed in **Table 5**. The inhibition by Cd²⁺, Fe²⁺, Li⁺ and Pb²⁺ occurred only after 1 mM while for EDTA²⁻, inhibition took place after 10 mM (data not shown).

Table 4. Inhibition of AChE activity from *C. ocellaris* by metal ions at 1 mM ($\rho < 0.05$).

Al ³⁺	As ³⁺	Ba ²⁺	Ca ²⁺	Cd ²⁺	Cu ²⁺	EDTA ²⁻	Fe ²⁺	Hg ²⁺	K ⁺	Li ⁺	Mg ²⁺	Mn ²⁺	Pb ²⁺	Zn ²⁺
-	75%	-	-	-	35%	-	-	100%	-	-	-	-	-	18%

– No effect at 1 mM

Table 5. IC₅₀ and Ki values estimated for AChE from *C. ocellaris* and IC₅₀ for *Pimephales promelas** in presence of some metal ions.

Species	<i>C. ocellaris</i>		<i>P. promelas</i>
Ions	IC ₅₀ (mM)	K _i (mM)	IC ₅₀ (mM)
As ³⁺	0.1	0.59 x 10 ⁻³	0.03
Cd ²⁺	6.14	36.4 x 10 ⁻³	0.57
Cu ²⁺	2.1	12.5 x 10 ⁻³	0.16
Hg ²⁺	0.22	1.34 x 10 ⁻³	1.60
Zn ²⁺	2.57	15.3 x 10 ⁻³	10.0

*From Olson and Christensen (1980)

The degree of AChE inhibition by pesticides is represented by the IC₅₀ reached for each pesticides and their respective inhibition constant (Ki). The most inhibitory pesticides in contact with *C. ocellaris* AChE were carbofuran, TEPP and carbaryl whose IC₅₀ were, respectively, 0.21 µM (Ki = 2.57 x 10⁻³ µM), 0.37 µM (Ki = 4.53 x 10⁻³ µM) and 4.41 µM (Ki = 5.4 x 10⁻² µM). Temephos did not reach IC₅₀ in the concentration range analyzed. **Table 6** also shows the IC₂₀ of the pesticides considering that 20% of AChE inhibition is an important point to develop threshold limits by several international regulations.

Table 6. IC₅₀ and K_i *in vitro* estimated for *C. ocellaris* and *C. macropomum* in presence of some organophosphorus and carbamate pesticides.

Species	IC ₂₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	K _i (μM)
Dichlorvos			
<i>Cichla ocellaris</i>	4.02	5.52	6.76 x 10 ⁻²
<i>Colossoma macropomum</i>	-	0.04	1.37 x 10 ⁻⁴
Diazinon			
<i>Cichla ocellaris</i>	182.57	2.9 x 10 ³	36.3
<i>Colossoma macropomum</i>	NE	NE	NE
Chlorpyrifos			
<i>Cichla ocellaris</i>	2.17	10.13	1.21 x 10 ⁻¹
<i>Colossoma macropomum</i>	-	7.6	2.61 x 10 ⁻²
Temephos			
<i>Cichla ocellaris</i>	NE	NE	NE
<i>Colossoma macropomum</i>	NE	NE	NE
TEPP			
<i>Cichla ocellaris</i>	0.32	0.37	4.53 x 10 ⁻³
<i>Colossoma macropomum</i>	-	3.7	1.27 x 10 ⁻²
Carbaryl			
<i>Cichla ocellaris</i>	1.18	4.41	5.4 x 10 ⁻²
<i>Colossoma macropomum</i>	-	33.8	1.16 x 10 ⁻¹
Carbofuran			
<i>Cichla ocellaris</i>	0.082	0.21	2.57 x 10 ⁻³
<i>Colossoma macropomum</i>	-	0.92	3.15 x 10 ⁻³

- not determined; NE – Negligible effect in the concentration range analyzed.

4. Discussion

Before investigating the use of a biomolecule as a biomarker it is necessary to know its normal behaviour through characterization of important features. In the case of enzymes, this characterization is the determination of kinetic and physicochemical parameters of their activity. The k_m and V_{max} found for *C. ocellaris* brain AChE are close to those present in the literature for the same parameters. Among other species, *C. ocellaris* values were comparable with *Colossoma macropomum* data from Assis *et al.* (2010). Moreover, they are in the range value for these parameters according to a recent review (Assis *et al.*, 2011) and not far from the values for another Cichlid (Nile tilapia) reported by Rodríguez-Fuentes and Gold-Bouchot (2004).

Optimum temperature of enzymes is not the same as the temperatures commonly found in habitat of the species. They work in a range around the optimum temperature, since after that enzymatic activity does not respond proportionally to increases in temperature and is at denaturation risk. Some enzymes may be damaged, even when long exposed to its optimum temperature. In our experience with other species, the stability peak occurs before optimum temperature. As we can see in the results session, the activity of *C. ocellaris* AChE presents low thermal stability immediately above of its optimum temperature.

No activity was found using the substrate S-butyrylthiocholine iodide and analyzing the behaviour of the enzyme in presence of selective inhibitors, the cholinesterase under study here can be confirmed as acetylcholinesterase. Rodríguez-Fuentes and Gold-Bouchot (2004), Jung *et al.* (2007), Pezzementi and Chatonnet (2010), reported absence of BChE activity in some fish species, mainly in brain.

The investigation of AChE inhibitors and interfering substances are relevant to identify the usefulness of this enzyme as a tool in environmental monitoring. Several studies reported the influence of ions and heavy metals on the activity of AChE (Abou-Donia and

Menzel, 1967; Tomlinson *et al.*, 1980; Olson and Christensen, 1980; Bocquené *et al.*, 1990; Reddy *et al.*, 2003). Therefore, high content of these ions in water samples from rivers, lakes and reservoirs can influence the detection of anticholinesterasic pesticides. These findings must be taken into account when biomarkers and biosensors based on AChE activity are proposed to analyze pesticide presence or other anticholinesterasic compound in some environment conditions. This fact can lead to false positives or negatives and misinterpretations in the analysis of results.

Several studies pointed to the influence of ions on the AChE activity by binding to peripheral sites (Tomlinson *et al.*, 1980; Olson and Christensen, 1980). Moreover, some organic and inorganic ions are suggested to change the hydration state of the active site, modifying the rate of hydrolysis of AChE (Hughes and Bennet, 1985).

Among the fifteen ions under study no one caused significant increase in *C. ocellaris* enzyme activity at 1 mM while five ions presented inhibitory effect. Copper and zinc are known as inhibitors of AChE (Tomlinson *et al.*, 1980; Olson and Christensen, 1980; Bocquené *et al.*, 1990). The inhibitions found here, respectively, for copper and zinc were 35 and 18%. The findings by Tomlinson *et al.* (1980) with partially purified *Electrophorus electricus* AChE for the same ions were both about 100% inhibition at 1 mM. Bocquené *et al.* (1990) also reported an inhibition of 100% in two marine species (*Scomber scomber* and *Pleuronectes platessa*) under copper exposition at 1 mM and for zinc the values for the same species were, respectively, 57.4 and 70% at 1 mM.

According to Valle and Ulmer (1972), mercury, lead and cadmium inhibit a large number of enzymes by strongly interacting with functional sulfhydryl groups of them and AChE is one of such enzymes. Moreover, they described that mercury was the most inhibitory while lead was the least one. In the present work, the most reactive was the Hg^{2+} ion, which

completely inactivated *C. ocellaris* AChE at 1 mM. Value discrepant in relation to Olson and Christensen (1980) who found for *Pimephales promelas* 50% inhibition at 1.6 mM. Gill *et al.* (1990) using AChE from *Puntius conchoni* observed 67% of inhibition at 0.001 mM. Tomlinson *et al.* (1981) working with AChE from *E. electricus* reported that Hg^{2+} and Pb^{2+} complex with the product of Ellman method thiocholine interfering in the assay, however in the same work was found that Hg^{2+} strongly inhibited the enzyme when using *p*-nitrophenyl acetate as substrate and this ion decreased the rate of carbamoylation of the enzyme active site by MC7 which proves the tight binding of Hg^{2+} to the peripheral sites of AChE. In this work, lead and cadmium only decreased AChE activity after 1 mM.

According to Olson and Christensen (1980), the ion As^{3+} (from AsO_2^-) is much more inhibitory than As^{5+} . Their findings with the first one were 50% of inhibition at 0.03 mmol/L using *P. promelas*. Here, we used As^{3+} , which inhibited the enzymatic activity by 75% at 1 mM. Other report about exposition to arsenic in *Scomber scomber* and *Pleuronectes platessa* describes 33 and 31% of inhibition, respectively at 1 mM (Bocquené *et al.*, 1990).

The chelating ion EDTA^{2-} only inhibited *C. ocellaris* AChE after 10 mM. Such results are in accordance with Tomlinson *et al.* (1981) and enable this chelating agent to be a protective measure against divalent metallic interferents.

OP compounds follow different behaviours in its interaction with the active site of cholinesterases depending on the chemical structure of these pesticides. The characteristics of the two groups of organophosphorus pesticides represented by the phosphates (oxon form; $\text{P}=\text{O}$) and the phosphorothioates (thion form; $\text{P}=\text{S}$) implies in important differences in the power of inhibition. The first group directly inhibits the cholinesterases since the higher electronegativity of the double-bonded oxygen in the phosphoester allows them to strongly interact with the hydroxyl serine group of the enzyme active site. The second one requires

bioactivation to achieve their full toxic potential. This biotransformation occurs mainly by environmental factors and oxidative desulfuration mediated by cytochrome P450 isoforms which are found in several tissues, including brain (WHO, 1986; Vale, 1998; Cunha Bastos *et al.*, 1999). This may be the reason why TEPP and dichlorvos (P=O) inhibited more intensely the AChE from *C. ocellaris* (and *C. macropomum* for comparison) than chlorpyrifos and diazinon (P=S). In addition, some of the organophosphorus compounds are lipophilic and they are absorbed and accumulated in fat, liver, kidneys and salivary glands. In general, the phosphorothioates are more lipophilic than the phosphates (Vale, 1998). It implies in sequestration of the lipophilic compounds by the brain lipids in the extract and the consecutive minor reactivity by such compounds.

Carbamate insecticides are direct inhibitors of AChE by carbamoylation of the active site and do not require biotransformation, so they can induce acute toxic effects faster than most of OP compounds. AChE can recover its activity in 24 h or less. However, the symptoms of CB inhibition can be more severe.

The importance of investigating the responses from AChE of several species is linked to the fact that different species present different susceptibility to the anticholinesterasic compounds (Assis *et al.*, 2011). The enzyme of a given species can provide the best monitoring capabilities of a compound and another species may be more sensitive to another compound. This monitoring should not be restricted to the environmental health. The enzyme sensitivity can be compared with parameters for human health (Maximum Concentration Levels – MCL's and Acceptable Daily Intakes - ADI's in natural or drinking waters, for example), since their threshold limits are below the limits for animals. According to *Food and Agriculture Organization* (2007) 20% inhibition of AChE activity is the point from which can be considered the presence of an anticholinesterasic agent. 20% of inhibition in mammals is

also the limit to estimate ADI's of anticholinesterasic compounds. Signals and symptoms appear from 50% inhibition and death occurs after 90%.

In the exposure to pesticides, the strongest inhibitory effect on *C. ocellaris* AChE was achieved by the carbamate carbofuran which is known to be a potent anticholinesterasic agent (Tham *et al.*, 2009). This carbamate IC₂₀ and IC₅₀ values (0.082 µM ~ 18 µg/L and 0.21 µM ~ 46.46 µg/L, respectively) for *C. ocellaris* AChE is below or next to the recommended limits of tolerance in some regulations. Brazilian regulations about Maximum Concentration Levels (MCL's) *Resolução CONAMA no. 20/1986* advocate 100 µg/L of organophosphates and carbamate compounds in natural waters of class 3 (water for domestic supply after conventional treatment; irrigation of tree crops, cereals and forage; watering of animals) while the *USEPA National Primary Drinking Water Standards* provides a Maximum Contaminant Level (MCL) of 40 µg/L for carbofuran.

In comparison with national and international institutions (USEPA, 1984; WHO/FAO, 2004; EFSA, 2004 and ANVISA, 2006), the ADI's for carbofuran cannot exceed, respectively, 0.005, 0.002, 0.001 and 0.002 mg/kg bw/day. It means that a person weighing 60 kg, for example, needs to drink 3 L of water which inhibited by 20% brain AChE of *C. ocellaris* to achieve the most demanding ADI for this compound.

AChE from the analyzed species still presented high sensitivity to the organophosphate TEPP (IC₂₀ = 0.32 µM ~ 94.84 µg/L and IC₅₀ = 0.37 µM ~ 107.37 µg/L). The only report about IC₅₀ *in vitro* for TEPP using fish is from Assis *et al.* (2010) in which *Colossoma macropomum* brain AChE was exposed to the same concentrations of this pesticide and presented a value 10-fold higher than with *C. ocellaris*.

The fact that this enzyme was less inhibited by ions such as copper, zinc, mercury and cadmium than other species in the literature and the lower costs of working with non-purified enzyme may become advantages of using *C. ocellaris* AChE as a biomarker for anticholinesterase pesticides, particularly carbofuran.

5. Conclusions

Assay conditions were provided for the use of AChE from *C. ocellaris* through the determination of several physicochemical and kinetics features of this enzyme.

The enzyme had its activity influenced by five ions. However, the inhibitory concentration of such ions is a too high concentration (excepting Hg^{2+} and As^{3+}) to be found in natural samples not associated with mining or industrial effluents (Payne *et al.*, 1996). In addition, the EDTA-resistant activity of the enzyme enables this chelating agent to be used in protection measures against some cations.

On the other hand, analyzing the inhibition produced by these substances along with other methods, it is possible to use the enzyme also as a biomarker for the presence of mercury ion, according to the probable waste composition from a given area.

In this study, some of the highly toxic pesticides were analyzed in relation to *C. ocellaris* AChE sensitivity. Relevant levels of enzymatic inhibition were achieved in concentrations below or next to the Maximum Concentration Levels (MCLs) or Acceptable Daily Intakes (ADIs) for these pesticides contemplated in national and international legislation in force. According to such results, *C. ocellaris* brain AChE is a promising tool for use in environmental monitoring programs for the carbamate carbofuran.

Acknowledgement — The authors would like to thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP/RECARCINE), Petróleo do Brasil S/A (PETROBRAS), Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca (SEAP/PR), Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico (CNPq) and Fundação de Apoio à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) for financial support.

6. References

- Abou-Donia, M.S., Menzel, D.B., 1967. Fish brain cholinesterase: its inhibition by carbamates and automatic assay. *Comp. Biochem. Physiol.* 21, 99-108.
- Antwi, L.A.K., 1987. Fish head acetylcholinesterase activity after aerial application of temephos in two rivers in Burkina Faso, West Africa. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 38, 461-466.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Índice monográfico C06: Carbofurano. Available in: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/b5fd6a004119a559bbc1bf65e55ae87b/C06++Carbofurano.pdf?MOD=AJPERES>. Access in: jun 2011. updated in: set 2006.
- Assis, C.R.D., Amaral, I.P.G., Castro, P.F., Carvalho Jr, L.B., Bezerra, R.S. 2007. Effect of dichlorvos on the acetylcholinesterase from tambaqui (*Colossoma macropomum*) brain. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 1451–1453.
- Assis, C.R.D., Castro, P.F., Amaral, I.P.G., Maciel Carvalho, E.V.M., Carvalho Jr, L.B., Bezerra, R.S., 2010. Characterization of acetylcholinesterase from the brain of the Amazonian tambaqui (*Colossoma macropomum*) and *in vitro* effect of organophosphorus and carbamate pesticides. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 2243–2248.
- Assis, C.R.D., Bezerra, R.S., Carvalho Jr., L.B., 2011. Fish cholinesterases as biomarkers of organophosphorus and carbamate pesticides. In: *Pesticides in modern world – Book 5*. Stoytcheva, M. (Ed). Intech, Rijeka, Croatia.

- Beauvais, S.L., Cole, K.J., Atchison, G.J., Coffey, M., 2002. Factors affecting brain cholinesterase activity in Bluegill (*Lepomis macrochirus*). *Water Air Soil Pollut.* 135, 249–264.
- Bocquené, G., Galgani, F., Truquet, P., 1990. Characterization and assay conditions for use of AChE activity from several marine species in pollution monitoring. *Mar. Environ. Res.* 30, 75-89.
- Chandrasekara, H.U., Pathiratne, A., 2005. Influence of low concentrations of Trichlorfon on haematological parameters and brain acetylcholinesterase activity in common carp, *Cyprinus carpio* L. *Aquac. Res.* 36, 144-149.
- Cheng, Y., Prusoff, W.H. 1973. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* 22 (23): 3099–108.
- Çokugras, A. N. Butyrylcholinesterase: Structure and Physiological Importance. *Turk. J. Biochem.* 2003; 28 (2); 54-61.
- Cunha Bastos, V.L.F., Silva Filho, M.V., Rossini, A., Cunha Bastos, J., 1999. The Activation of Parathion by Brain and Liver of a Brazilian Suckermouth Benthic Fish Shows Comparable in Vitro Kinetics. *Pest. Biochem. Physiol.* 64, 149–156.
- EFSA. European Food Safety Agency. 2004. Draft Assessment Report (DAR): Carbofuran vol. 1, Brussels, BE.
- Fairbrother, A., Bennett, J. K., 1988. The usefulness of cholinesterase measurement, *J. Wildl. Dis.* 24, 587-590.

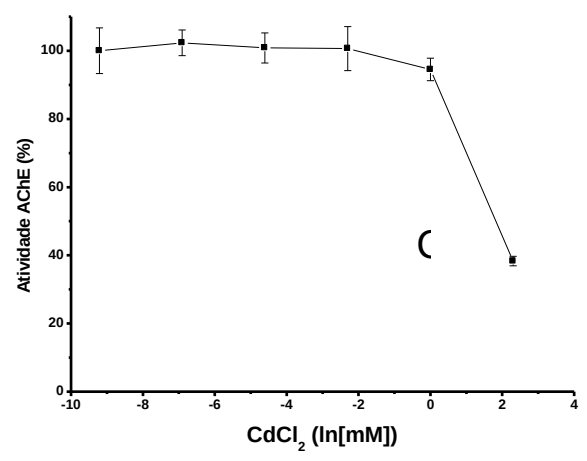
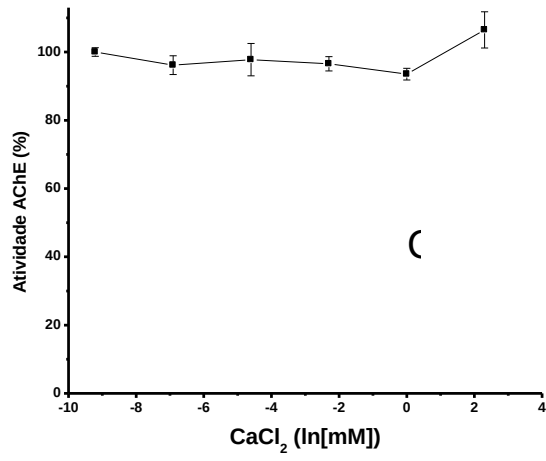
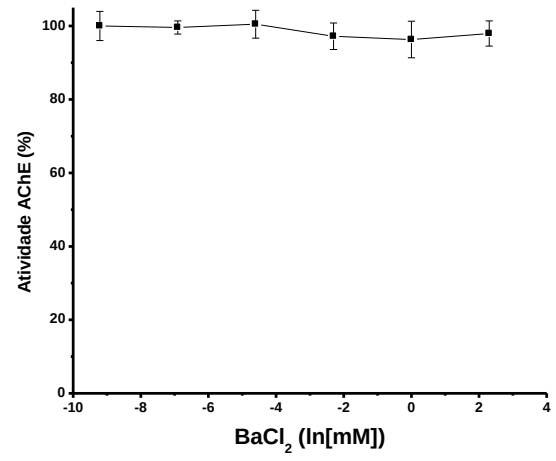
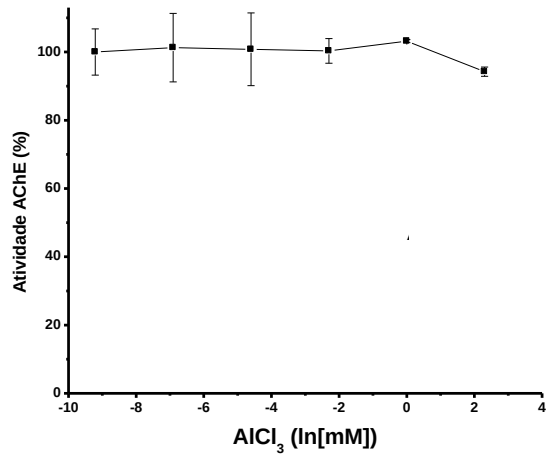
- FAO. 2007. Food and Agriculture Organization. Pesticides in food report 2007. FAO plant production and protection paper 191. Food and Agriculture Organization, Rome, Italy.
- Gill, T.S., Tewari, H., Pande, J., 1990. Use of the fish enzyme system in monitoring water quality: effects of mercury on tissue enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.* 97C, 287-292.
- Hazel, J., 1969. The effect of thermal acclimation upon brain acetylcholinesterase activity of *Carassius auratus* and *Fundulus heteroclitus*. *Life Sci.* 8, 775–784.
- Hughes, R.J., Bennett, J., 1985. Effect of metal ions on the activity of acetylcholinesterase. *Biochem. Soc. Trans.* 13, 219-220.
- Jarrard, H.E.; Delaney, K.R.; Kennedy, C.J. 2004. Impacts of carbamate pesticides on olfactory neurophysiology and cholinesterase activity in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquat. Toxicol.* 69, p. 133–148.
- Jung, J.-H., Addison, R.F., Shim, W.J., 2007. Characterization of cholinesterases in marbled sole, *Limanda yokohamae*, and their inhibition in vitro by the fungicide iprobenfos. *Mar. Envir. Res.* 63, 471–478.
- Monserat, J.M., Geracitano, L.A., Bianchini, A., 2003. Current and future perspectives using biomarkers to assess pollution in aquatic ecosystems. *Comments. Toxicol.* 9, 255–269.
- Nicolet, Y.; Lockridge, O.; Masson, P.; Fontecilla-Camps, J. C.; Nachon, F. 2003. Crystal Structure of Human Butyrylcholinesterase and of Its Complexes with Substrate and Products. *J. Biol. Chem.* 278: 41141–41147.

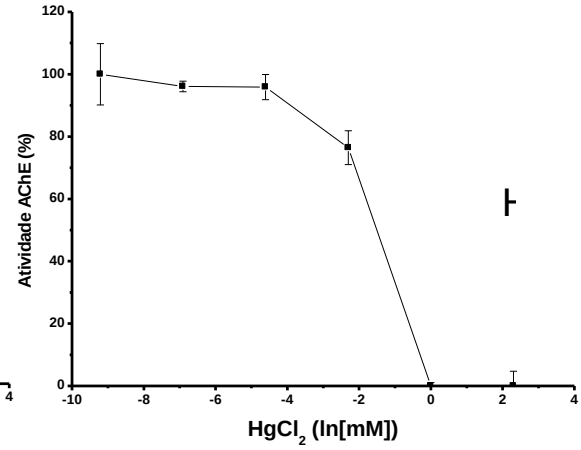
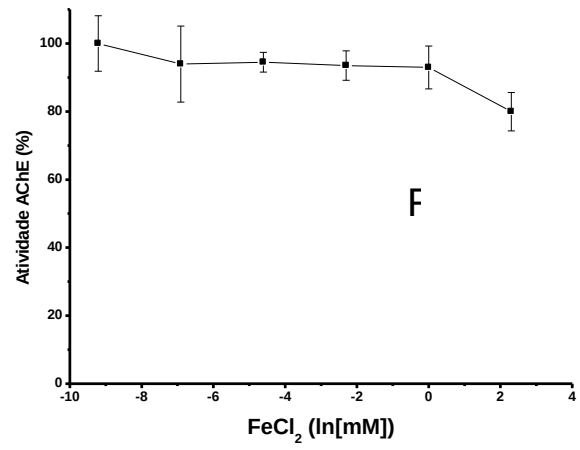
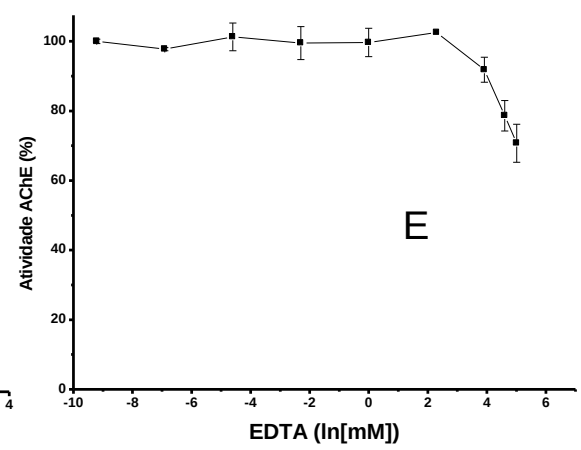
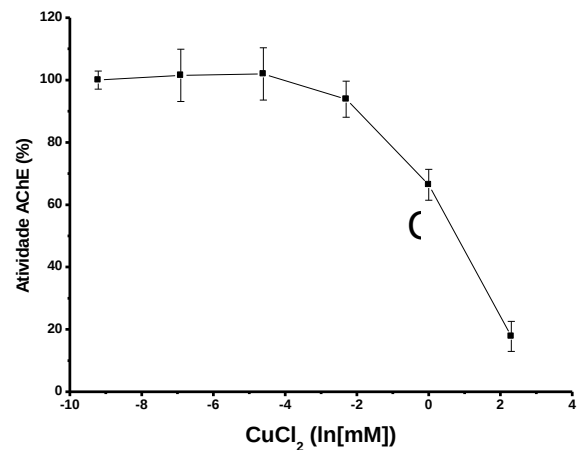
- Olson, D.L., Christensen, G.M., 1980. Effects of water pollutants and other chemicals on fish acetylcholinesterase (*in vitro*). *Environ. Res.* 21, 327-335.
- Payne, J. F., Mathieu, A., Melvin, W., Fancey, L.L., 1996. Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. *Mar. Pollut. Bull.* 32, 225-231.
- Pezzementi, L., Chatonnet, A., 2010. Evolution of cholinesterases in the animal kingdom. *Chem. Biol. Interact.* 187, 27–33.
- Quinn, D.M., 1987. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chem. Rev.* 87, 955-979.
- Reddy, G.R., Basha, M.R., Devi, C.B., Suresh, A., Baker, J.L., Shafeek, A., Heinz, J., Chetty, C.S., 2003. Lead induced effects on acetylcholinesterase activity in cerebellum and hippocampus of developing rat. *Int. J. Devl. Neuroscience.* 21, 347–352.
- Rendón-von Osten, J., Ortiz-Arana, A., Guilhermino, L., Soares, A.M.V.M., 2005. In vivo evaluation of three biomarkers in the mosquitofish (*Gambusia yucatana*) exposed to pesticides. *Chemosphere.* 58, 627-636.
- Rodríguez-Fuentes, G., Gold-Bouchot, G., 2000. Environmental monitoring using acetylcholinesterase inhibition in vitro. A case study in two Mexican lagoons. *Mar. Env. Res.* 50, 357-360.
- Rodríguez-Fuentes, G., Gold-Bouchot, G., 2004. Characterization of cholinesterase activity from different tissues of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Mar. Environ. Res.* 58, 505-509.

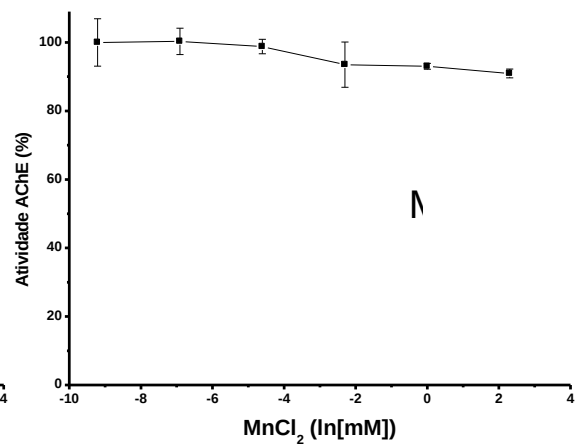
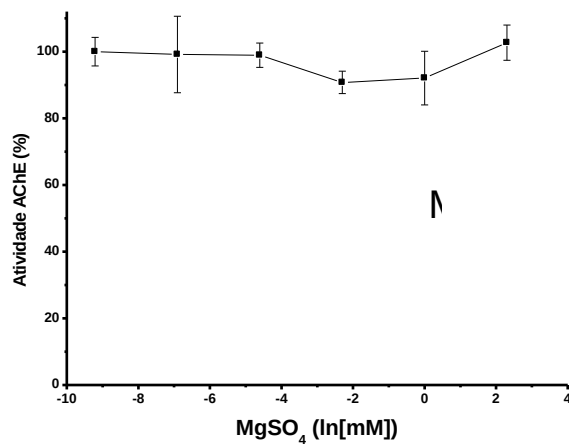
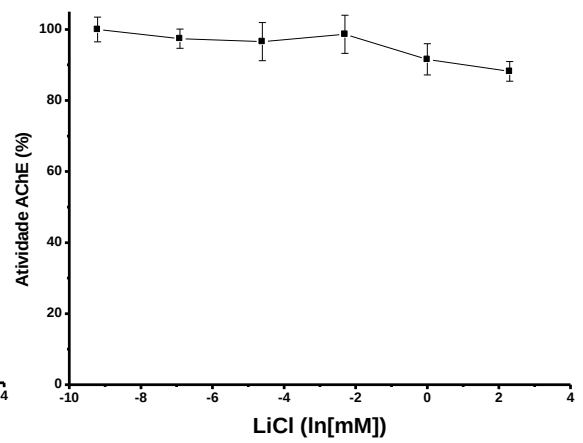
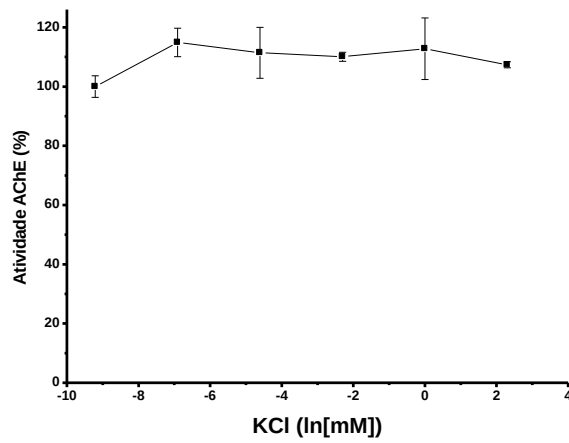
- Rodríguez-Fuentes, G., Armstrong, J., Schlenk, D., 2008. Characterization of muscle cholinesterases from two demersal flatfish collected near a municipal wastewater outfall in Southern California. *Ecotox. Environ. Safe.* 69, 466–471.
- Scott, G.R., Sloman, K.A., 2004. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquat. Toxicol.* 68, 369–392.
- Sedmak, J.J., Grossberg, S.E., 1977. A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. *Anal. Biochem.* 79, 544-552.
- Shaoguo, R., Xuanhui, W., Ming, J., Yongqi, L. 2003. In vivo and in vitro inhibitions of red drum (*Sciaenops ocellatus*) brain acetylcholinesterase and liver carboxylesterase by monocrotophos at sublethal concentrations. *Water Air Soil Poll.* 149, 17–25.
- Soreq H, Zakut H. 1990. Cholinesterase genes: multileveled regulation. In *Monographs in Human Genetics*, ed. RS Sparkes, 13:1-102. Basel: Karger.
- Taylor, P., Radic, Z., Hosea, N.A., Camp, S., Marchot, P., Berman, H.A. 1995. Structural basis for the specificity of cholinesterase catalysis and inhibition. *Toxicol. Lett.* 82/83, p. 453-458.
- Tham, L.G., Perumal, N., Syed, M.A., Shamaan, N.A., Shukor, M.Y., 2009. Assessment of *Clarias batrachus* as a source of acetylcholinesterase (AChE) for the detection of insecticides. *J. Environ. Biol.* 30, 135-138.
- Tomlinson, G., Mutus, B., McLennan, I., 1980. Modulation of acetylcholinesterase activity by peripheral site ligands. *Mol. Pharmacol.* 18, 33-39.

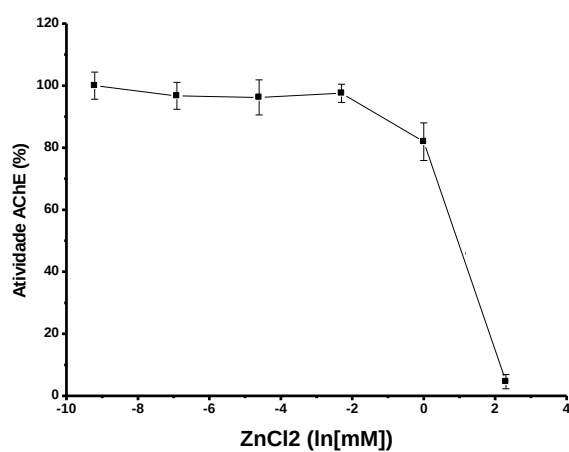
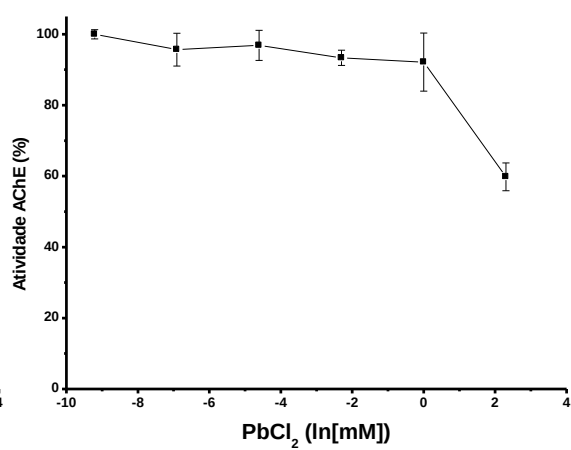
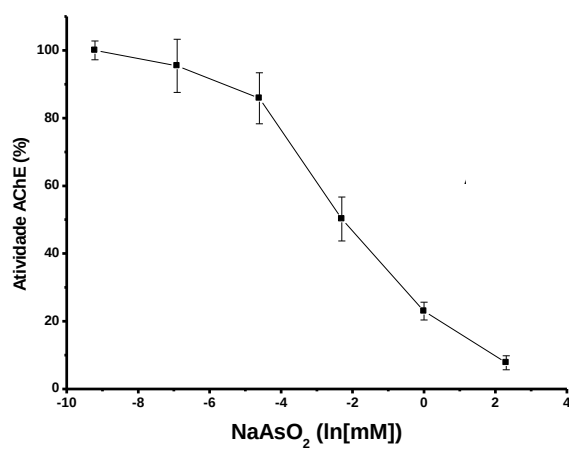
- Tomlinson, G., Mutus, B., McLennan, I., 1981. Activation and inactivation of acetylcholinesterase by metal ions. *Can. J. Biochem.* 59, 728-735.
- Tõugu, V., 2001. Acetylcholinesterase: mechanism of catalysis and inhibition. *Curr. Med. Chem.* 1, 155-170.
- USEPA. United States Environmental Protection Agency. 2011. Pesticides Industry Sales and Usage - 2006 and 2007 Market Estimates. U.S. Environmental Protection Agency. Washington, DC. February 2011. Available at: http://www.epa.gov/opp00001/pestsales/07pestsales/market_estimates2007.pdf.
- USEPA. United States Environmental Protection Agency. 1984. Chemical Fact Sheet number 24: Carbofuran. Insecticide/Rodenticide Branch. Registration Division (TS-767). Washington, DC, US.
- Valle, B.L., Ulmer, D.D. 1972. Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. *Ann. Rev. Biochem.* 41, 91-128.
- Vale, J.A., 1998. Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP) insecticide poisoning. *Toxicol. Lett.* 102-103, 649-652.
- WHO. World Health Organization. 1986. Organophosphorus insecticides: a general introduction. Environmental Health Criteria 63, Geneva, CH.
- WHO/FAO. World Health Organization/Food and Agriculture Organization. 2004. Pesticide Residues in Food 2003: Evaluations For Food and Agriculture Organization of the United Nations. World Health Organization. JMPR 2003. Rome, IT.

Supplementary Data – Campos Silva *et al.*, 2011



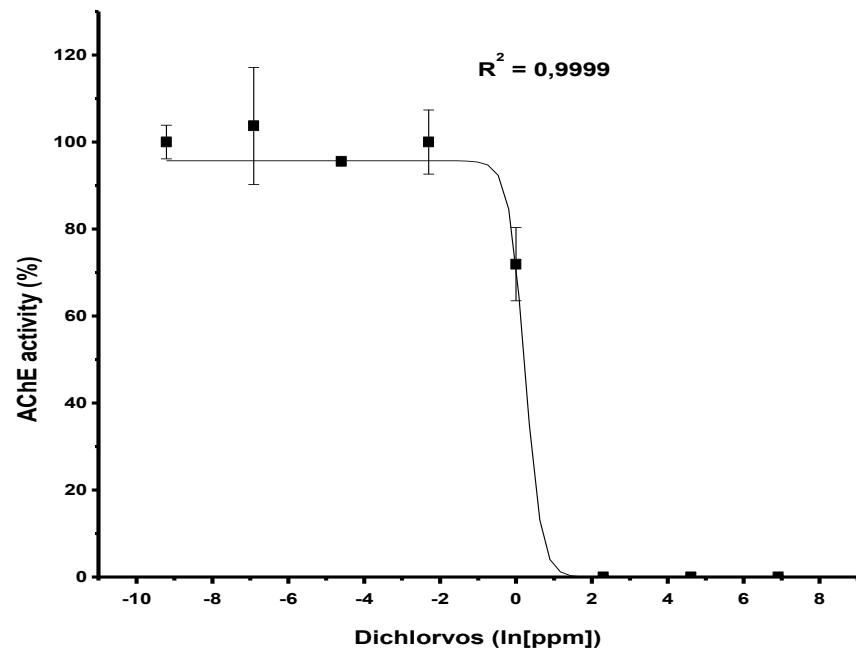




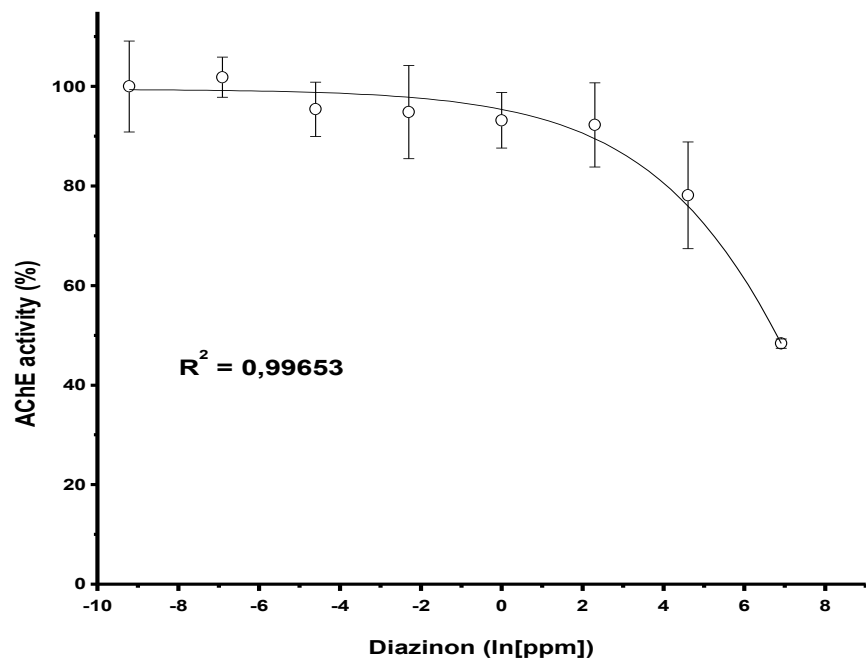


***C. ocellaris* brain AChE activity
in presence of several ions**

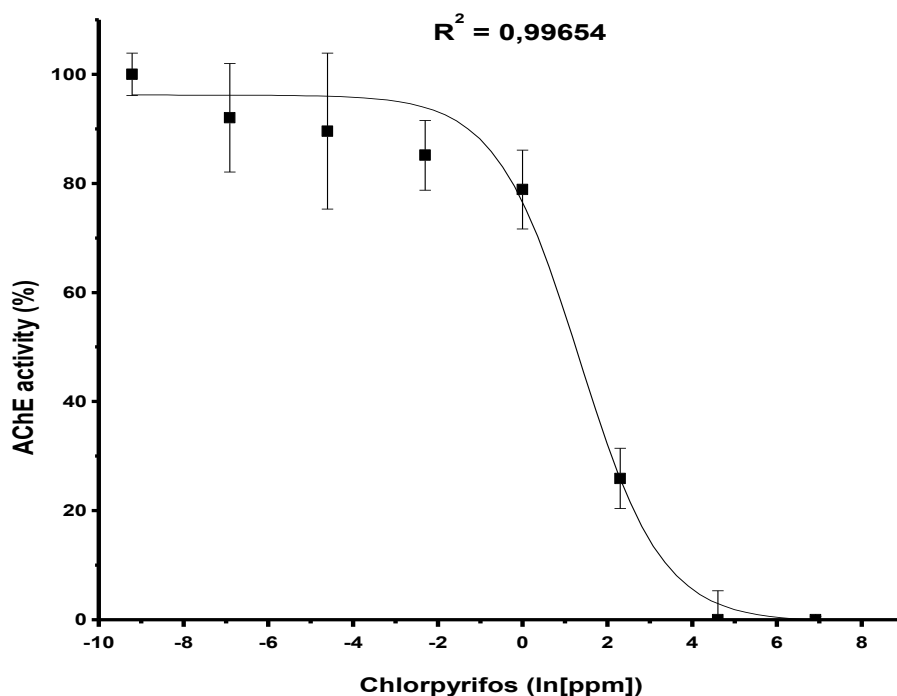
Supplementary Data - Campos Silva *al.*, 2011



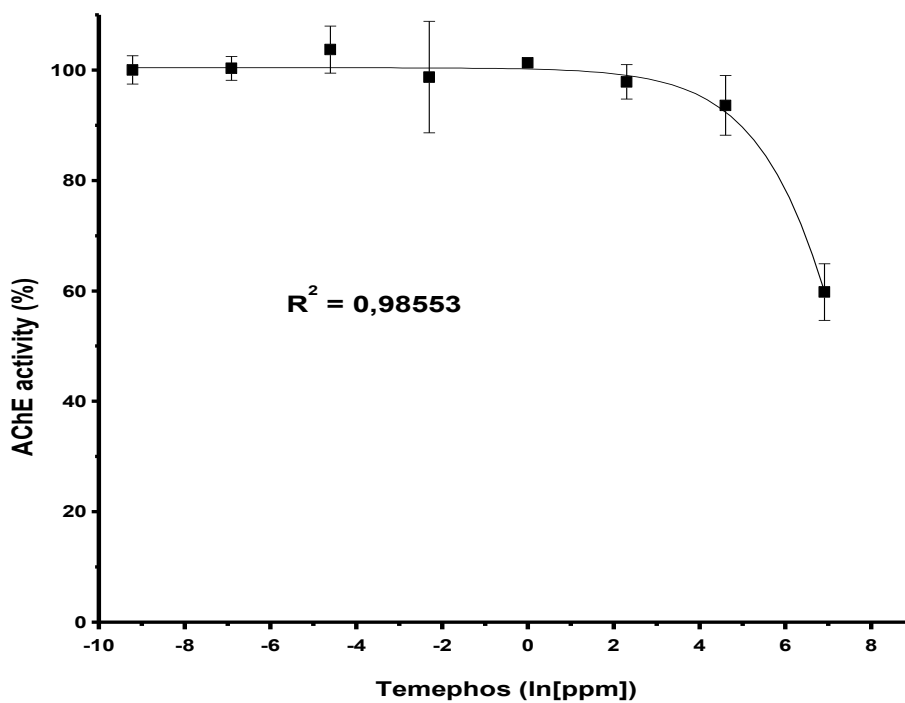
Activity of *C. ocellaris* brain AChE in presence of increasing concentrations (0-1000 mM) of the organophosphorus dichlorvos.



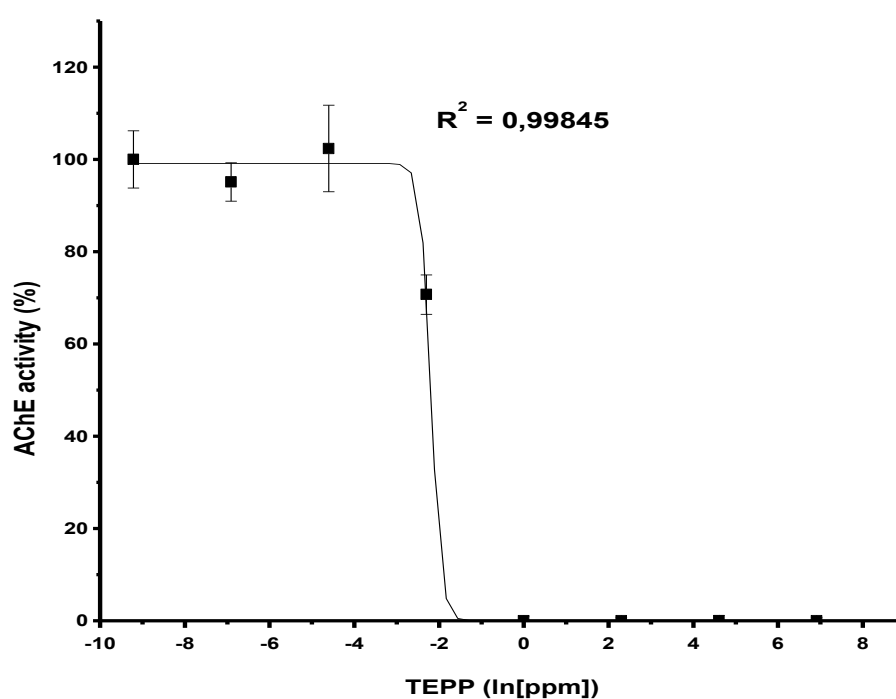
Activity of *C. ocellaris* brain AChE in presence of increasing concentrations (0-1000 mM) of the organophosphorus diazinon.



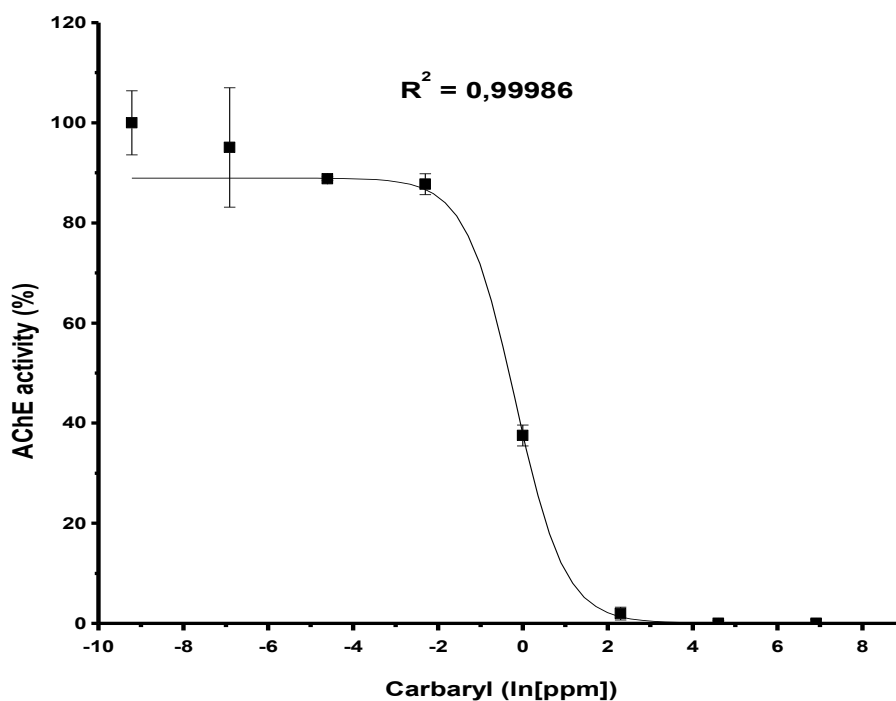
Activity of *C. ocellaris* brain AChE in presence of increasing concentrations (0-1000 mM) of the organophosphorus chlorpyrifos.



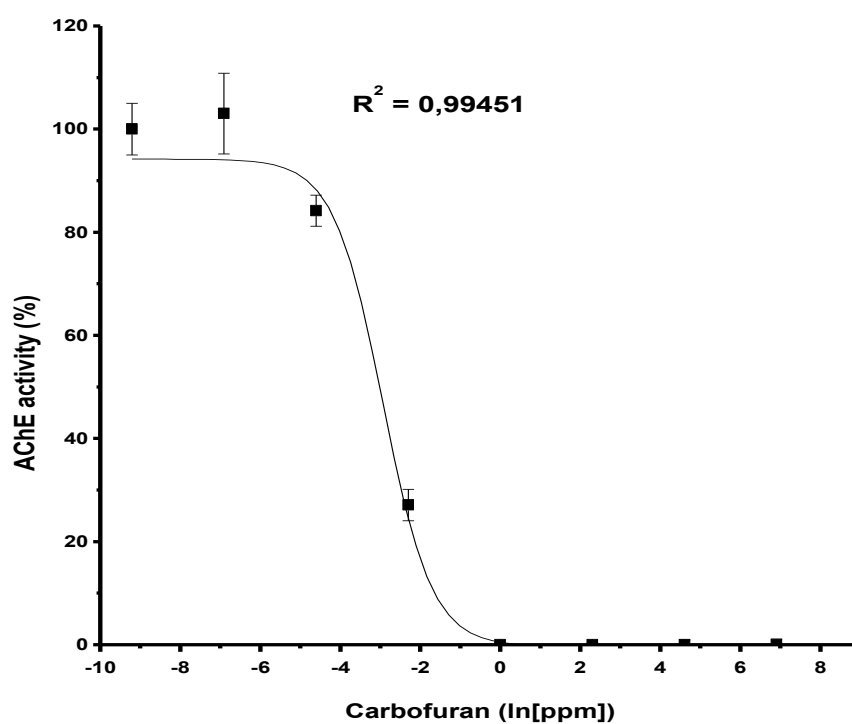
Activity of *C. ocellaris* brain AChE in presence of increasing concentrations (0-1000 mM) of the organophosphorus temephos.



Activity of *C. ocellaris* brain AChE in presence of increasing concentrations (0-1000 mM) of the organophosphorus tetraethyl pyrophosphate (TEPP).



Activity of *C. ocellaris* brain AChE in presence of increasing concentrations (0-1000 mM) of the carbamate carbaryl.



Activity of *C. ocellaris* brain AChE in presence of increasing concentrations (0-1000 mM) of the carbamate carbofuran.

Figure captions

Figure 1 – (A) Effect of pH on the AChE activity from brain of *C. ocellaris*. The pH range was attained by using citrate-HCl, citrate-phosphate and tris-HCl buffers; (B) Effect of temperature on the activity of brain AChE from *C. ocellaris*. The activity was assayed in a range from 25 to 80°C; (C) AChE thermal stability assayed from 20 to 80°C on the enzyme preparation for 30 min and after 15 min equilibrium at 25°C.

Figure 2 – Activity of *C. ocellaris* brain AChE in presence of increasing concentrations (0-10 mM) of the selective inhibitors: (A) Iso-OMPA; (B) BW284c51; and the total ChEs inhibitors: (C) neostigmine; (D) eserine

