

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS

RAFAELA ZANELLA PUCHALE

**USO DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS EM AVALIAÇÕES
AMBIENTAIS**

LAGES

2021

RAFAELA ZANELLA PUCHALE

**USO DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS EM AVALIAÇÕES
AMBIENTAIS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências Ambientais, Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Ambientais.

Orientadora: Prof^a Dr^a Indianara Fernanda Barcarolli

LAGES

2021

RAFAELA ZANELLA PUCHALE

USO DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS EM AVALIAÇÕES
AMBIENTAIS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências Ambientais, Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Ambientais.

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Indianara Fernanda Barcarolli
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

Prof Dr Gilmar Conte
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

Profª Drª Ariane Andreola
Centro Universitário Unifacvest

Lages, 30 de agosto de 2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por me orientar e guiar os meus passos até aqui.

Agradeço imensamente aos meus pais, pela educação, apoio, amor, carinho, e principalmente por sempre nos incentivarem a estudar e buscar o aperfeiçoamento.

Agradeço a minha irmã, pelo amor, companheirismo e apoio de sempre, que se fez ainda mais necessário durante esta etapa.

Agradeço a Pedro Paulo Cordeiro, hoje meu esposo, pelo amor, carinho, paciência, por estar sempre presente e me apoiando mesmo quando estivemos fisicamente distantes.

Agradeço a Universidade do Estado de Santa Catarina, por prover ensino de qualidade e com excelentes profissionais.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Toxicologia Ambiental pelo auxílio sempre que necessário.

Agradeço a Prof. Dr^a Cláudia por me auxiliar nessa caminhada, pelo conhecimento passado e principalmente por me aconselhar quando necessitei, seu auxílio foi determinante.

Agradeço imensamente a minha orientadora, Prof Dr^a Indianara, por ter aceitado esse desafio junto comigo, por todo conhecimento passado, pela paciência, compreensão e auxílio.

Agradeço aos demais professores do Curso de Pós-graduação em Ciências Ambientais, pelos ensinamentos e pela dedicação em construir e manter a qualidade do ensino deste curso.

Um agradecimento especial a todos os moradores do “Predinho”, por compartilharem comigo um ano de suas vidas e me permitirem conhecer pessoas que ficarão para sempre em meu coração.

RESUMO

A contaminação de ecossistemas aquáticos é uma grande preocupação ambiental em virtude das inúmeras substâncias que recebem, principalmente em economias em desenvolvimento. A industrialização e a agricultura são os principais responsáveis pelo aumento de contaminantes e conseqüentemente da deterioração da qualidade da água. Devido a isso, surgiu a necessidade de metodologias abrangentes objetivando avaliar e monitorar a qualidade dos ecossistemas e as suas alterações. O biomonitoramento surge como uma ferramenta potencial nas avaliações de risco de substâncias químicas e de contaminantes emergentes. Por meio das avaliações toxicológicas é possível obter respostas dos organismos expostos a compostos químicos, aumentando a confiabilidade das avaliações. Dessa forma, a utilização de biomarcadores bioquímicos têm sido aplicados em programas de monitoramento ambiental e por meio da avaliação simultânea com análises químicas fornecem dados precisos evidenciando a presença de poluentes e seus efeitos nocivos sobre os ecossistemas e sua biota. Com base nisso, esta dissertação apresenta a avaliação de biomarcadores bioquímicos em duas situações distintas. No Capítulo 1, foram utilizados como biomarcadores as enzimas catalase, glutathione-S-transferase e acetilcolinesterase para determinar os efeitos da ação antrópica em um manguezal do litoral norte catarinense, já no Capítulo 2, as mesmas enzimas foram utilizadas para determinar os efeitos de diferentes concentrações de progesterona em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). No Capítulo 1, por se tratar de um estudo preliminar, as enzimas indicaram a presença de compostos orgânicos e metais, contudo são necessárias novas coletas para elucidar os reais efeitos dos contaminantes nos locais avaliados. Já no Capítulo 2, não houve significância da atividade enzimática da catalase e GST nas brânquias e fígado da tilápia do Nilo, em contrapartida a progesterona foi capaz de inibir expressivamente a atividade da acetilcolinesterase em todas as concentrações testadas. Além disso, houve a mortalidade de todos os indivíduos submetidos a concentração mais alta do hormônio, o que indica o grande efeito neurológico da progesterona em peixes da espécie *Oreochromis niloticus*.

Palavras chave: Biomonitoramento. Organismos aquáticos. Contaminantes emergentes.

ABSTRACT

Contamination of aquatic ecosystems is a major environmental concern due to the substances they reflect, especially in developing economies. Industrialization and agriculture are mainly responsible for the increase in contaminants and, consequently, the deterioration of water quality. Therefore, there was a need for comprehensive methodologies aimed at evaluating and monitoring the quality of ecosystems and how they change. Biomonitoring emerges as a potential tool in risk assessments of transformed substances and emerging contaminants. Through toxicological evaluations it is possible to obtain responses from organisms exposed to chemical compounds, increasing the confidence of the evaluations. Thus, the use of biochemical biomarkers has been defined in environmental monitoring programs and through simultaneous assessment with accurate data analysis showing the presence of pollutants and their harmful effects on ecosystems and their biota. Based on that, this dissertation presents an evaluation of biochemical biomarkers in two distinct situations. In Chapter 1, catalase, glutathione-s-transferase and acetylcholinesterase enzymes were used as biomarkers to determine the effects of anthropogenic action in a mangrove on the northern coast of Santa Catarina, in Chapter 2, the enzymes were used for the effects of progesterone spas in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). In Chapter 1, as this is a preliminary study, the enzymes indicated the presence of mineral compounds and metals, requiring new collections necessary to elucidate the real effects of the contaminants in the locations taken. In Chapter 2, there was no significance of the enzymatic activity of catalase and GST in the gills and liver of Nile tilapia, in contrast, progesterone significantly inhibited the activity of acetylcholinesterase in all tested restrictions. In addition, there was a mortality of all peoples found in the highest concentration of the hormone, which indicates the great neurological effect of progesterone on fish of the species *Oreochromis niloticus*.

Keywords: Biomonitoring. Aquatic organisms. Emerging contaminants.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Processo de bioacumulação.....	15
Figura 2: Crustáceos coletados no Ponto 1.	31
Figura 3: Peixes coletados no Ponto 1.....	32
Figura 4: Chama marés coletados no Ponto 2 e peixes coletados no Ponto 3	32
Figura 5: Atividade da Catalase em crustáceos coletados no Ponto 1.	35
Figura 6: Atividade da Catalase em peixes coletados no Ponto 1.	36
Figura 7: Atividade da Catalase para caranguejos Chama-maré coletados no Ponto 2 e peixes coletados no Ponto 3.....	37
Figura 8: Atividade da Glutathione-S-Transferase nos crustáceos coletados no Ponto 1.....	38
Figura 9: Atividade da Glutathione-S-Transferase peixes coletados no Ponto 1.....	39
Figura 10:Atividade da Glutathione-S-Transferase em caranguejos chama- maré coletados no Ponto 2 e peixes coletados no Ponto 3.	40
Figura 11: Atividade da Acetilcolinesterase em crustáceos coletados no Ponto 1.....	41
Figura 12: Atividade da Acetilcolinesterase em peixes coletados no Ponto 1.	42
Figura 13: Atividade da Acetilcolinesterase dos caranguejos chama-maré coletados no Ponto 2 e peixes coletados no Ponto 3.....	43
Figura 14: Atividade da Catalase nas brânquias.....	55
Figura 15: Atividade da Catalase no Fígado.	56
Figura 16: Atividade da Glutathione-S-Transferase nas brânquias.....	57
Figura 17: Atividade da Glutathione-S-Transferase no fígado.	58

Figura 18: Atividade da Acetilcolinesterase no cérebro. 59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ANOVA	Análise de variância
CAT	Catalase
CAV	Centro de Ciências Agroveterinárias
CDNB	1-cloro-2,4 dinitrobenzeno
DCPU	3,4- dichlorofhenylurea
DTNB	5,5 – dithio-bis-2 nitrobenzonic acid
EROS	Espécies reativas de oxigênio
GSH	Glutationa reduzida
GST	Glutaiona-S-Transferase
LABTOX	Laboratório de Toxicologia Ambiental
pH	Potencial hidrogeniônico
POPs	Poluentes orgânicos persistentes
UDESC	Universidade do Estado de Santa Catarina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	13
1.1. Toxicidade, biomonitoramento e biomarcadores	13
1.2. OBJETIVOS	18
1.2.1 Objetivo geral	18
1.2.2 Objetivos específicos	18
1.2.3 Estrutura da dissertação	18
REFERÊNCIAS.....	20
2. INFLUÊNCIA DAS AÇÕES ANTRÓPICAS EM UM MANGUEZAL NO LITORAL NORTE CATARINENSE	25
RESUMO	25
ABSTRACT	26
2.1. INTRODUÇÃO.....	28
2.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
2.2.1 Coleta e preparo das amostras	31
2.2.2 Atividades enzimáticas.....	33
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
2.3.1 Catalase	34
2.3.2 Glutaciona-s-transferase.....	38
2.3.3 Acetilcolinesterase	41
2.4. CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS.....	44
3. EFEITOS DA PROGESTERONA EM BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS NA TILÁPIA DO NILO	48
RESUMO	48
ABSTRACT	49
3.1. INTRODUÇÃO.....	50
3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	51
3.2.1 Atividade enzimática	52
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
3.2.1 Atividade da Catalase	54
3.2.2 Atividade da Glutaciona-S-Transferase	57

3.2.3 Atividade da Acetilcolinesterase.....	58
3.4. CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS.....	60

INTRODUÇÃO GERAL

O destino final da maioria dos contaminantes são rios, lagos, aquíferos ou mares que recebem águas residuais com uma mistura complexa de xenobióticos (DÍAZ; LÓPEZ, 2013). Nas últimas décadas, a qualidade da água se deteriorou em virtude do aumento considerável de contaminantes, devido a industrialização, agricultura e outros agentes, além da captação de água doce (KIANI; RAHIMPOUR, 2019).

De acordo com Abarikwu e colaboradores (2017), a poluição em ecossistemas terrestres e aquáticos é uma séria preocupação ambiental, principalmente para economias em desenvolvimento. Os efeitos dos contaminantes nos organismos aquáticos podem se manifestar em todos os níveis de organização em escala hierárquica desde o nível celular até atingir a comunidade e o ecossistema como um todo (DÍAZ; LÓPEZ, 2013).

Segundo Li; Zheng e Liu (2010) existem demandas urgentes por abordagens metodológicas abrangentes com o objetivo de avaliar o estado real desses ecossistemas e monitorar sua taxa de alterações. Partindo do pressuposto, o monitoramento ambiental dá embasamento para investigações de avaliação de exposição da cinética ambiental e dos efeitos tóxicos das substâncias, além da prevenção e do controle dos níveis ambientais encontrados que podem ter efeito sobre a saúde humana (SISINNO; OLIVEIRA-FILHO, 2013).

Através das ferramentas de biomonitoramento existe grande potencial de aumentar a confiança das avaliações do risco de substâncias químicas regulamentadas e de poluentes emergentes (GAVRILESCU et al., 2015).

1.1. Toxicidade, biomonitoramento e biomarcadores

Segundo Abarikwu e colaboradores (2017), a toxicidade ao longo de uma cadeia alimentar ocorre quando o organismo contendo metais bioacumulados, por exemplo, é ingerido por um organismo de nível trófico mais alto. O mesmo ocorre com outros tipos de contaminantes.

Os estudos de biomonitoramento visam averiguar os impactos de contaminantes sobre os organismos aquáticos (LI; ZHENG; LIU, 2010). Por meio desses estudos é possível obter respostas dos organismos, tanto dos indivíduos quanto das comunidades, para avaliar a exposição ambiental aos compostos químicos (SISINNO; OLIVEIRA-FILHO. 2013).

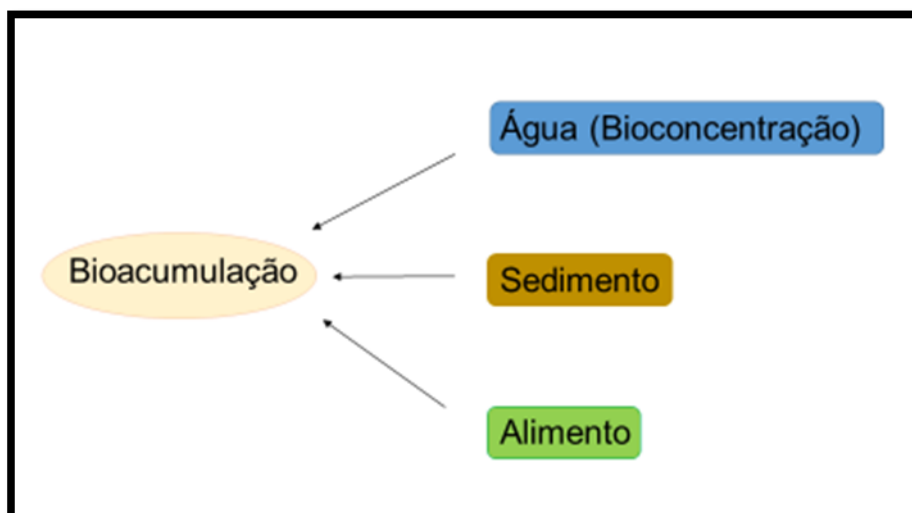
Os parâmetros analisados são diretos, quando é medida a concentração da substância química nos organismos, e indiretos são os que envolvem um critério biológico na avaliação da qualidade ambiental, como mudanças morfológicas, citológicas, fisiológicas ou bioquímicas dos indivíduos, além da ausência e abundância de populações de indivíduos (SISINNO; OLIVEIRA-FILHO. 2013).

Visando avaliar o risco potencial ao ser humano, bem como a extensão da poluição ambiental, faz-se necessária a determinação da capacidade de bioacumulação de contaminantes em certos organismos (ABARIKWU et al., 2017).

A absorção e a retenção de um contaminante por um organismo podem ocasionar a concentração elevada do composto, com a probabilidade de causar efeitos deletérios (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008). Essa acumulação pode causar danos graves ao fígado, rins, sistema nervoso central, tecidos mucosos, trato intestinal e aos sistemas reprodutivos, além de possuírem efeitos cancerígenos em humanos e animais (RAKNUZZAMAN et al., 2016; SHARMA; SINGH; SIDDIQI, 2014).

Zagatto e Bertoletti (2008) frisam que a processo de acumulação ou bioacumulação pode ocorrer a partir do ambiente ou por meio da ingestão de alimentos contaminados, conforme esquematizado na Figura 1.

Figura 1 - Processo de bioacumulação



Adaptado de Zagatto;Bertoletti, 2008.

Para Zagatto e Bertoletti (2008), a extensão da bioacumulação dependerá do número de níveis e das espécies que compõe a teia alimentar, da natureza do composto, bem como a concentração do mesmo em cada nível da cadeia e o tempo de contato estabelecido.

Nesse contexto, são utilizados biomarcadores como preditores sensíveis aos estresses ambientais (SANTOS et al., 2019), os quais são definidos como variações genéticas, bioquímicas, celulares, fisiológicas ou comportamentais que são medidas através de amostras de tecido ou fluído corporal, que evidenciam a exposição e efeito de um ou mais poluentes químicos (DUARTE et al., 2016).

Um biomarcador ou um marcador biológico é um indicador biológico que fornece informações sobre a exposição de um organismo a um xenobiótico, o efeito da exposição no organismo ou a susceptibilidade do organismo aquele xenobiótico (HAMZA-CHAFFAI, 2014; SOGORB; VILANOVA; ESTEVEZ, 2014).

Segundo Hanza-Chaffai (2014) as respostas de biomarcadores ocorrem em diferentes níveis das organizações, desde organismos subcelulares a organismos inteiros, até atingir o ecossistema. O autor destaca que primeiramente ocorrem efeitos a nível molecular, seguidos das respostas bioquímicas ou celulares, posteriormente tecidos e órgãos, e. por fim, corpo inteiro.

De acordo com Estévez, Vilanova e Sogorb (2019) em concordância com Santos e seus colaboradores (2019), os biomarcadores são classificados em três grupos: os marcadores de exposição, marcadores de efeito ou resposta e por fim, os marcadores de susceptibilidade.

Os biomarcadores de exposição permitem avaliar se o indivíduo está exposto a fonte estressora ou a presença de um xenobiótico, principalmente se esse já foi absorvido pelo organismo (SOGORB; VILANOVA; ESTEVEZ, 2014), em geral são usados para prever a dose a que o organismo foi exposto que pode estar relacionada as alterações que resultaram em um estado de doença (HAMZA-CHAFFAI, 2014).

Os biomarcadores de efeito determinam o grau de exposição é suficiente para causar um efeito ou uma resposta naquele organismo exposto, dessa forma, antes do aparecimento de consequências clínicas, ocorre uma fase, dita assintomática, onde as alterações podem estar se desenvolvendo a níveis bioquímicos, celulares, tecido e funcionais (DÍAZ; LÓPEZ, 2013; ESTÉVEZ; VILANOVA; SOGORB, 2019a). Sendo assim, são úteis na tomada de decisão antes mesmo do aparecimento dos efeitos adversos serem identificados (SOGORB; VILANOVA; ESTEVEZ, 2014).

Os biomarcadores de susceptibilidade, por sua vez, permitem identificar quais indivíduos de uma população são particularmente mais susceptíveis aquele xenobiótico (ESTÉVEZ; VILANOVA; SOGORB, 2019a). De acordo com Díaz e López (2013), as mudanças de cada indivíduo incluem fatores genéticos e receptores que alteram a susceptibilidade de um organismo a essa exposição.

Para Duarte e seus colaboradores (2019), os biomarcadores tem sido aplicados em vários programas de monitoramento ambiental. Aliar o uso de biomarcadores biológicos e morfológicos as análises químicas, através de uma avaliação simultânea, fornecem dados precisos, evidenciando a presença de poluentes, bem como seus efeitos negativos sobre ecossistemas aquáticos e sua biota, além de possibilitar ações para restaurar e preservar o local.

Sogorb e demais pesquisadores (2014) frisam a necessidade do conhecimento prévio sobre as toxicocinética, ou seja, o tecido onde o xenobiótico é potencialmente acumulado, as taxas e rotas de excreção, bem

como a relevância de determinar corretamente a amostra biológica a ser biomonitorada.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar os biomarcadores bioquímicos em diferentes espécies de crustáceos no ambiente natural e analisar os efeitos da progesterona em *Oreochromis niloticus*.

1.2.2 Objetivos específicos

- a) Determinar a atividade da catalase, glutathione-S-transferase em diferentes tecidos dos crustáceos e peixes coletados no manguezal do Rio Perequê;
- b) Determinar a atividade da catalase em brânquias e fígado dos peixes da espécie *Oreochromis niloticus*, *expostos a progesterona*;
- c) Determinar a atividade da glutathione S-transferase em brânquias e fígado dos peixes da espécie *Oreochromis niloticus*, *expostos a progesterona*;
- d) Determinar a atividade da acetilcolinesterase no cérebro dos peixes da espécie *Oreochromis niloticus*, *expostos a progesterona*.

1.2.3 Estrutura da dissertação

Esta dissertação é composta pela introdução geral e por mais dois capítulos.

O Capítulo 1, intitulado “Influência das ações antrópicas em um manguezal no litoral norte catarinense” baseia-se em um estudo inicial com espécies de crustáceos coletadas no manguezal do Rio Perequê. Neste estudo são apresentados os resultados das atividades enzimáticas em crustáceos e peixes coletados em dois pontos visivelmente afetados pelas ações antrópicas e um ponto não antropizado, a fim de verificar a influência dos contaminantes sobre os organismos.

O Capítulo 2, intitulado “Efeitos da progesterona em biomarcadores bioquímicos na tilápia do Nilo”, são apresentados os resultados de um teste de toxicidade estático realizados com a exposição da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), a diferentes concentrações de progesterona.

REFERÊNCIAS

ABARIKWU, S. O. et al. **Biomarkers of oxidative stress and health risk assessment of heavy metal contaminated aquatic and terrestrial organisms by oil extraction industry in Ogale, Nigeria.** [s.l.] Elsevier Ltd, 2017. v. 185

ÁGUAS DE ITAPEMA. Levantamento de Lançamentos de Efluentes no Rio Perequê e Rio da Fita. **Plano Nacional de Saneamento Básico de Itapema/SC**, 2013.

ARAÚJO, C. R. M.; SANTOS, V. L. A.; GONSALVES, A. A. Acetylcholinesterase - AChE: A pharmacological interesting enzyme. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 6, p. 1818–1834, 2016.

ATLI, G.; CANLI, M. Response of antioxidant system of freshwater fish *Oreochromis niloticus* to acute and chronic metal (Cd, Cu, Cr, Zn, Fe) exposures. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, n. 8, p. 1884–1889, 2010.

BATHIGE, S. D. N. K. et al. A mu class glutathione S-transferase from Manila clam *Ruditapes philippinarum* (RpGST μ): Cloning, mRNA expression, and conjugation assays. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 162, n. 1, p. 85–95, 2014.

BERETTA, M. et al. Occurrence of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in marine sediments in the Todos os Santos Bay and the north coast of Salvador, Bahia, Brazil. p. 1278–1286, 2014.

BLANCO, M. et al. Science of the Total Environment Assessing the environmental quality of sediments from Split coastal area (Croatia) with a battery of cell-based bioassays. 2017.

BRANDÃO, E. JOSÉ. Revista do Curso de Direito O ecossistema manguezal: aspectos ecológicos e jurídicos. v. 1, p. 1–16, 2011.

CABEZA, Y. et al. Monitoring the occurrence of emerging contaminants in treated wastewater and groundwater between 2008 and 2010. The Baix Llobregat (Barcelona, Spain). **Journal of Hazardous Materials**, v. 239–240, p. 32–39, 2012.

CAPPARELLI, M. V.; ABESSA, D. M.; MCNAMARA, J. C. Effects of metal contamination in situ on osmoregulation and oxygen consumption in the mudflat fiddler crab *Uca rapax* (Ocypodidae, Brachyura). **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 185–186, p. 102–111, 2016.

CARVALHO-NETA, R. N. F.; ABREU-SILVA, A. L. Glutathione S-Transferase as biomarker in *Sciades herzbergii* (Siluriformes: Ariidae) for environmental monitoring: the case study of São Marcos Glutathion S-

Transferasa como biomarcador en *Sciades herzbergii* (Siluriformes : Ariidae) para el monitoreo. v. 41, n. 2, p. 217–225, 2013.

CASTRO, A. A. DE et al. Organophosphorus degrading enzymes: Molecular basis and perspectives for enzymatic bioremediation of agrochemicals. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 41, n. 5, p. 471–482, 2017.

COGO, A. J. D. et al. Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadoras de impactos ambientais Using oxidative stress enzymes as biomarkers in environmental impacts. **Natureza on line**, v. 7, p. 37–42, 2009.

DÍAZ, J. E. S.; LÓPEZ, E. L. Freshwater Fish as Sentinel Organisms: From the Molecular to the Population Level, a Review. **Intech**, v. i, n. tourism, p. 13, 2013.

DUARTE, L. F. DE A. et al. Multi-level biological responses in *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Brachyura, Ucididae) as indicators of conservation status in mangrove areas from the western atlantic. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 133, p. 176–187, 2016.

DUARTE, L. F. DE A. et al. Mangrove metal pollution induces biological tolerance to Cd on a crab sentinel species subpopulation. **Science of the Total Environment**, v. 687, p. 768–779, 2019.

ESTÉVEZ, J.; VILANOVA, E.; SOGORB, M. A. Biomarkers for Testing Toxicity and Monitoring Exposure to Xenobiotics. **Biomarkers in Toxicology**, p. 1165–1174, 2019

FRANÇA, J. F. DE et al. Determination of 17 α -ethinylestradiol and toxic metals in surface waters, and estimation of daily intake. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 192, n. 1, p. 1–10, 2020.

FREIRE, C. A.; ONKEN, H.; MCNAMARA, J. C. A structure – function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs ☆. v. 151, p. 272–304, 2008.

GAVRILESCU, M. et al. Emerging pollutants in the environment: Present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation. **New Biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 147–156, 2015.

GLISIC, B. et al. Characterization of glutathione-S-transferases in zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic Toxicology**, v. 158, p. 50–62, 2015.

GOMES, T. B. et al. Sublethal psychotropic pharmaceutical effects on the model organism *Danio rerio*: Oxidative stress and metal dishomeostasis. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 171, n. January, p. 781–789, 2019.

HAMZA-CHAFFAI, A. Usefulness of Bioindicators and Biomarkers in Pollution Biomonitoring. **International Journal of Biotechnology for**

Wellness Industries, v. 3, n. 1, p. 19–26, 2014.

ISLAS-FLORES, H. et al. Diclofenac-induced oxidative stress in brain, liver, gill and blood of common carp (*Cyprinus carpio*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 92, p. 32–38, 2013.

JESUS, W. . et al. Biomarcadores enzimáticos e histológicos em brânquias de *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Brachyura, Ucididae) indicativos de impactos ambientais em uma região portuária do nordeste do Brasil. p. 1413–1423, 2020.

KAUSHAL, J. et al. Catalase enzyme: Application in bioremediation and food industry. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, p. 192–199, 2018.

KIANI, M. R.; RAHIMPOUR, M. R. **Aquatic/water environment contamination, treatment, and use**. [s.l.] INC, 2019.

KRYCH-MADEJ, J.; GEBICKA, L. Interactions of nitrite with catalase: Enzyme activity and reaction kinetics studies. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 171, p. 10–17, 2017.

KULKARNI, R.; DEOBAGKAR, D.; ZINJARDE, S. Metals in mangrove ecosystems and associated biota: A global perspective. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 153, n. September 2017, p. 215–228, 2018.

KUMAR, N. et al. Impacts of acute toxicity of arsenic (III) alone and with high temperature on stress biomarkers, immunological status and cellular metabolism in fish. **Aquatic Toxicology**, v. 214, n. June, p. 105233, 2019a.

KUMAR, S. et al. Trace metals contamination in different compartments of the Sundarbans mangrove: A review. **Marine Pollution Bulletin**, v. 148, n. August, p. 47–60, 2019b.

KÜMMERER, K. Emerging Contaminants. **Treatise on Water Science**, v. 3, p. 69–87, 2011.

LEE, K. H.; CHA, M.; LEE, B. H. Neuroprotective Effect of Antioxidants in the Brain. p. 1–29, 2020.

LI, L.; ZHENG, B.; LIU, L. Biomonitoring and bioindicators used for river ecosystems: Definitions, approaches and trends. **Procedia Environmental Sciences**, v. 2, p. 1510–1524, 2010.

MACHADO, K. S. et al. Ocorrência de hormônios sexuais femininos na bacia do Rio Iguaçu, Curitiba, Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum - Technology**, v. 36, n. 3, p. 421–427, 2014.

MARIN, C. B. et al. Identificação das Ligações Prediais de Esgoto Irregulares ou Clandestinas no Município de Itapema (SC). **Revista DAE**, v. 64, n. 202,

p. 6–19, 2016.

MILATOVIC, D.; ZAJA-MILATOVIC, S.; GUPTA, R. C. **Biomarkers of Oxidative/Nitrosative Stress and Neurotoxicity**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019.

MIRON, D. DOS S. et al. Effects of the herbicides clomazone , quinclorac , and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae). v. 61, p. 398–403, 2005.

NAIDU, R. et al. Emerging contaminants in the environment: Risk-based analysis for better management. **Chemosphere**, v. 154, p. 350–357, 2016.

OLIVEIRA, F. G. DE et al. Toxicological effects of anthropogenic activities in *Geophagus brasiliensis* from a coastal river of southern Brazil: A biomarker approach. **Science of the Total Environment**, v. 667, p. 371–383, 2019.

OMAR, T. F. T. et al. Occurrence and level of emerging organic contaminant in fish and mollusk from Klang River estuary, Malaysia and assessment on human health risk. **Environmental Pollution**, v. 248, p. 763–773, 2019.

PIMENTEL, M. F. et al. Endocrine disruption in *Sphoeroides testudineus* tissues and sediments highlights contamination in a northeastern Brazilian estuary. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 188, n. 5, 2016.

PINHEIRO, M. A. A. et al. Accumulation of six metals in the mangrove crab *Ucides cordatus* (Crustacea: Ucididae) and its food source, the red mangrove *Rhizophora mangle* (Angiosperma: Rhizophoraceae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 81, p. 114–121, 2012.

PINHO, L.; REIS, A. F. Processo de crescimento urbano-turístico: estudo do Balneário Meia Praia, no município de Itapema [Santa Catarina, Brasil]. **Labor e Engenho**, v. 7, n. 3, p. 142–157, 2013.

RAKNUZZAMAN, M. et al. Trace metal contamination in commercial fish and crustaceans collected from coastal area of Bangladesh and health risk assessment. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 17, p. 17298–17310, 2016.

RATHI, B. S.; KUMAR, P. S.; SHOW, P. L. A review on effective removal of emerging contaminants from aquatic systems: Current trends and scope for further research. **Journal of Hazardous Materials**, p. 124413, 2020.

SALBEGO, A.; PRETTO, C.; ROSA, G. Herbicide Formulation with Glyphosate Affects Growth , Acetylcholinesterase Activity , and Metabolic and Hematological Parameters in Piava (*Leporinus obtusidens*). p. 740–745, 2010.

SANCHES, A. L. M. Avaliação dos efeitos deletérios do diuron e de seus metabólitos em lambaris (*Astyanax* sp .): testes de toxicidade , marcadores de estresse oxidativo , marcadores genotóxicos e enzimas de

biotransformação Avaliação dos efeitos deletérios do diuron e de. 2014.

SANTOS, C. C. M. DOS et al. Influence of seasonality on the natural modulation of oxidative stress biomarkers in mangrove crab *Ucides cordatus* (Brachyura, Ucridae). **Comparative Biochemistry and Physiology -Part A: Molecular and Integrative Physiology**, v. 227, p. 146–153, 2019.

SHARMA, B.; SINGH, S.; SIDDIQI, N. J. Biomedical Implications of Heavy Metals Induced Imbalances in Redox Systems. v. 2014, 2014.

SIGNORIN, M. et al. Hidrodinâmica e nutrientes inorgânicos dissolvidos no estuário do Rio Perequê, SC. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**, v. 14, n. 2, p. 13, 2010.

SISINNO, C. L. S.; OLIVEIRA-FILHO, E. C. **Princípios da Toxicologia Ambiental: conceitos e aplicações**. Rio de Janeiro: Interciência, 2013.

SOGORB, M. A.; VILANOVA, E.; ESTEVEZ, J. Biomarkers in biomonitoring of xenobiotics. p. 965–973, 2014.

STARLING, M. C. V. M.; AMORIM, C. C.; LEÃO, M. M. D. Occurrence, control and fate of contaminants of emerging concern in environmental compartments in Brazil. **Journal of Hazardous Materials**, p. 17–36, 2019.

TKACHENKO, H.; KURHALUK, N. Tissue-specific responses of oxidative stress biomarkers and antioxidant defenses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* during a vaccination against furunculosis. 2014.

TORRES, N. H. et al. Environmental aspects of hormones estradiol, 17 β -estradiol and 17 α -ethinylestradiol: Electrochemical processes as next-generation technologies for their removal in water matrices. **Chemosphere**, v. 267, 2021.

VANDERMEERSCH, G. et al. Environmental contaminants of emerging concern in seafood - European database on contaminant levels. **Environmental Research**, v. 143, p. 29–45, 2015.

ZAGATTO, P.A., BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações**. 2 ed. São Carlos: RiMa, 2008

ZHANG, Z. et al. Copper, zinc, manganese, cadmium and chromium in crabs from the mangrove wetlands in Qi'ao Island, South China: Levels, bioaccumulation and dietary exposure. **Watershed Ecology and the Environment**, 2019.

ZHANG, Z.; XU, X.; SUN, Y. Heavy metal and organic contaminants in mangrove ecosystems of China: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, 2014.

2. INFLUÊNCIA DAS AÇÕES ANTRÓPICAS EM UM MANGUEZAL NO LITORAL NORTE CATARINENSE

RESUMO

Os manguezais são ecossistemas de grande relevância ecológica e social em todo o mundo, por possuírem características únicas, abrigar uma diversidade biológica ampla e ser berçário de diversas espécies marinhas, além de fornecerem bens e serviços para a sociedade. Apesar disso, vem sendo ameaçados pelas atividades antrópicas, como o progresso de urbanização, a industrialização, a agricultura e aquicultura. No Estado de Santa Catarina, o balneário de Meia Praia, localizado no município de Itapema, apresentou alta densidade construtiva, verticalização e ocupação sazonal nas últimas décadas, alterando ecossistemas, organizações preexistentes e modos de vida. O rio Perequê, mais importante recurso hídrico da região, vem sofrendo com lançamento de agrotóxicos, efluentes domésticos não tratados e resíduos, além do aterramento de suas margens que tem destruído os manguezais da região. Sendo os manguezais, fonte de renda e alimentação para as populações locais, por meio da pesca artesanal e exploração dos crustáceos, moluscos e peixes, a contaminação desses ambientes torna-se bastante preocupante e uma questão de saúde pública. Em uma coleta preliminar foram coletados indivíduos de siri azul (*Callinectes sapidus*), siri vermelho (*Goniopsis cruentata*), siri pintado (espécie não identificada), caranguejos chama-maré (*Uca spp.*) e um siri não identificado, além de indivíduos de Tainha (*Mugil cephalus*), Baiacu-mirim (*Sphoerodes testudines*), Robalo flecha (*Centropomus palleus*), Carapeba (*Diapterus auratus*) e Lambari (*Astyanax spp*) em três pontos distintos do rio Perequê em Itapema, Santa Catarina. Os tecidos desses indivíduos foram submetidos a análise de determinação de atividade enzimática da Catalase, Glutathione-S-Transferase e Acetilcolinesterase. A atividade da Catalase foi significativa para todos os crustáceos avaliados, com exceção ao siri vermelho (*Goniopsis cruentata*), enquanto os peixes apresentaram atividade significativa os tecidos avaliados, exceto o Baiacu-mirim (*Sphoerodes*

testudines) que apresentou menor atividade no fígado, já a Carapeba (*Diapterus auratus*) teve atividade menor na brânquia. Os lambaris Lambari (*Astyanax spp*), apresentaram aumento da CAT no fígado. No que se refere a Glutathione-S-Transferase, apenas o siri vermelho apresentou aumento da atividade no hepatopâncreas, indicando mais sensibilidade aos efeitos do ambiente quando comparado aos demais crustáceos analisados. Em relação aos peixes avaliados, houve aumento da atividade da GST no cérebro da tainha e do robalo flecha, enquanto o baiacu-mirim apresentou aumento da enzima no fígado, assim como os lambaris, já a carapeba o aumento ocorreu nas brânquias. Para a Acetilcolinesterase, houve redução da atividade para os caranguejos chama-maré, nos demais houve relevância nos resultados encontrados. Nos peixes avaliados a AChE teve atividade aumentada no fígado do carapeba, brânquias do robalo flecha, cérebro do baiacu-mirim, enquanto foi reduzida nas brânquias do robalo flecha, assim como no cérebro dos lambaris. As atividades das enzimas indicam a presença de compostos orgânicos e metais, contudo são necessárias novas coletas para esclarecer os reais efeitos dos contaminantes nos locais avaliados.

Palavras-chave: Toxicologia. Biomarcadores. Manguezal.

ABSTRACT

Mangroves are ecological and social ecosystems around the world, as they have unique characteristics, harbor a wide biological diversity and are a nursery for several marine species, in addition to providing goods and services to society. Despite this, it has been threatened by human activities, such as the progress of urbanization, industrialization, agriculture and aquaculture. In the State of Santa Catarina, the Meia Praia resort, located in the municipality of Itapema, has a high construction density, verticalization and seasonal occupation in recent decades, altering ecosystems, preexisting associations and ways of life. The Perequê river, the most important water resource in the region, has been suffering from the release of pesticides, untreated domestic effluents and residues, in addition to the filling of its banks, which has destroyed the mangroves in the region. As the mangroves

are a source of income and food for local places, through artisanal fishing and exploitation of crustaceans, molluscs and fish, environmental contamination becomes quite worrying and a matter of public health. In a preliminary collection, blue crab (*Callinectes sapidus*), red crab (*Goniopsis cruentata*), spotted crab (unidentified species), tidal crabs (*Uca spp.*) and one unidentified crab, in addition to mullet (*Mugil cephalus*) were collected, Pufferfish (*Sphoerodes testudines*), Sea bass (*Centropomus palleus*), Carapeba (*Diapterus auratus*) and Lambari (*Astyanax spp*) in three different points of the Perequê river in Itapema, Santa Catarina. Malignant tissues were found in the analysis to determine the enzymatic activity of Catalase, Glutathione-S-Transferase and Acetylcholinesterase. Catalase activity was summarized for all recovered crustaceans, except for the red crab (*Goniopsis cruentata*), while the fish activity was tested on the selected tissues, except for the Pufferfish (*Sphoerodes testudines*) which presented lower liver activity, whereas Carapeba (*Diapterus auratus*) had less activity in the gills. Lambari lamabris (*Astyanax spp*), increased liver CAT increase. With regard to Glutathione-S-Transferase, only red crab showed increased activity in the hepatopancreas, indicating more sensitivity to environmental effects when compared to other related crustaceans. Regarding the fish taken, there was an increase in GST activity in the brain of the mullet and sea bass, while the small puffer fish showed an increase in the enzyme in the liver, as did the lambaris, while the carapeba showed an increase in the gills. For Acetylcholinesterase, there was a reduction in activity for the tidal crabs, in the other results obtained in the results found. In fish taken, AChE had increased activity in the liver of the carapeba, gills of the arrow bass, the brain of the small puffer fish, while it was reduced in the gills of the arrow bass, as well as in the brain of the lambaris. Enzyme activities indicate the presence of liquid ingredients, however further collections are needed to clarify the effects of contaminants in the locations

Keywords: Toxicology. Biomarkers. Mangrove

2.1. INTRODUÇÃO

Historicamente o desenvolvimento e o crescimento das populações estão relacionados a ocupação de áreas litorâneas. Nesses locais estão concentradas áreas densamente urbanizadas e densamente povoadas, juntamente com portos, indústrias e turismo, o que afeta significativamente os ecossistemas costeiros, impactando nos serviços ecossistêmicos e conseqüentemente a saúde humana (BLANCO et al., 2017).

O destino final da maioria dos contaminantes são rios, lagos, aquíferos ou mares que recebem águas residuais com uma mistura complexa de xenobióticos (DÍAZ; LÓPEZ, 2013). Os manguezais também estão expostos a esses contaminantes, além do escoamento de efluentes industriais e de atividades marinhas (KULKARNI; DEOBAGKAR; ZINJARDE, 2018). Os mangues são conhecidos por acumularem vários poluentes como metais pesados, petróleo e pesticidas (ZHANG et al., 2019; ZHANG; XU; SUN, 2014).

De acordo com Abarikwu e colaboradores (2017), a poluição por metais pesados em ecossistemas terrestres e aquáticos é uma séria preocupação ambiental, principalmente para economias em desenvolvimento. Os efeitos dos contaminantes nos organismos aquáticos podem se manifestar em todos os níveis de organização em escala hierárquica desde o nível celular até atingir a comunidade e o ecossistema como um todo (DÍAZ; LÓPEZ, 2013).

Sendo o manguezal um importante ecossistema de transição entre o ambiente marinho e terrestre, que proporciona condições de alimentação, proteção e reprodução para diversas espécies animais (CRAFT, 2016), como peixes camarões, siris, caranguejos e algumas espécies de aves marinhas (PINHO; REIS, 2013), e fonte de renda e alimento para as populações locais por meio da pesca artesanal e exploração dos crustáceos, moluscos e peixes (BRANDÃO, 2011), a contaminação desses ecossistemas torna-se bastante preocupante e uma questão de saúde pública.

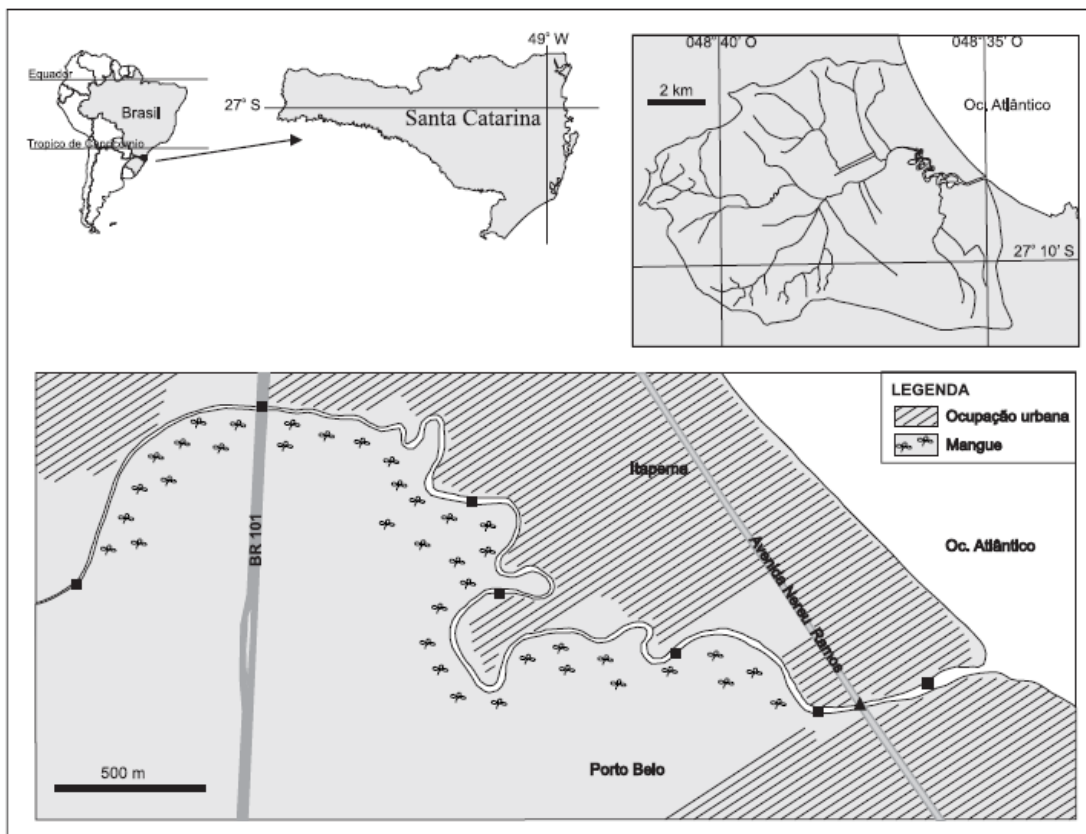
Segundo Li; Zheng e Liu (2010) existem demandas urgentes por abordagens metodológicas abrangentes com o objetivo de avaliar o estado real desses ecossistemas e monitorar suas taxa de alterações. Partindo do pressuposto, o monitoramento ambiental dá embasamento para investigações de avaliação de exposição da cinética ambiental e dos efeitos tóxicos das substâncias, além da prevenção e do controle dos níveis ambientais encontrados que podem ter efeito sobre a saúde humana (SISINNO; OLIVEIRA-FILHO, 2013).

Os caranguejos são sensíveis a poluição por metais por viverem nos sedimentos, onde esses compostos químicos ficam armazenados. São organismos com bons requisitos para serem utilizados como bioindicadores, por serem relativamente sedentários, de fácil identificação, abundantes no ambiente, de vida longa, de ampla distribuição e disponíveis durante todo o ano (ZHANG et al., 2019). Dessa forma, espécies de caranguejos se tornam espécies adequadas como biomonitores de poluição por metais pesados (PINHEIRO et al., 2012; ZHANG et al., 2019).

Com o objetivo de avaliar a qualidade ambiental do manguezal localizado no litoral norte do Estado de Santa Catarina foram realizadas análises de biomarcadores bioquímicos em siris, caranguejos e peixes de três pontos distintos.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no manguezal localizado no rio Perequê, localizado entre os municípios de Porto Belo e Itapema (Figura 1; 27° 08' 41" S e 48° 35' 07" W), em Santa Catarina e possui aproximadamente 14 km de extensão, passando em sua maior extensão pela área rural dos dois municípios (OLIVEIRA et al., 2019; SIGNORIN et al., 2010).



Fonte: SIGNORIN et al.(2010).

O rio Perequê nasce no Morro da Miséria, no conjunto geomorfológico da Serra do Tijucas, atravessa a parte rural do município na altura da região do Sertão do Trombudo e deságua no Oceano Atlântico(ÁGUAS DE ITAPEMA, 2013).

As águas do rio Perequê são utilizadas para o abastecimento público dos municípios de Itapema, Porto Belo e Bombinhas (MARIN et al., 2016), além de dessedentação animal, pesca artesanal (OLIVEIRA et al., 2019) e irrigação das lavouras de arroz (ÁGUAS DE ITAPEMA, 2013). Oliveira e seus colaboradores (2019), destacam a influência da grande área de rizicultura irrigada realizada junto as suas margens esquerdas do rio Perequê, cujos efluentes são lançados diretamente ao corpo hídrico pelos canais de drenagem.

2.2.1 Coleta e preparo das amostras

Foram coletados peixes, siris e chama marés em três pontos do rio Perequê com diferentes tipos de vegetação e salinidade.

No ponto 1, onde se encontra o manguezal, foram coletados 7 siris, siri azul (*Callinectes sapidus*), siri vermelho (*Goniopsis cruentata*), siri pintado (espécie não identificada) e um siri não identificado, conforme Figura 2. No mesmo ponto foram coletados 9 peixes, sendo de 4 espécies diferentes: 3 indivíduos de Tainha (*Mugil cephalus*), 2 indivíduos de Baiacumirim (*Sphoerodes testudines*), 2 indivíduos de Robalo flecha (*Centropomus palleus*) e 2 indivíduos de Carapeba (*Diapterus auratus*) (Figura 3).

Figura 2: Crustáceos coletados no Ponto 1.



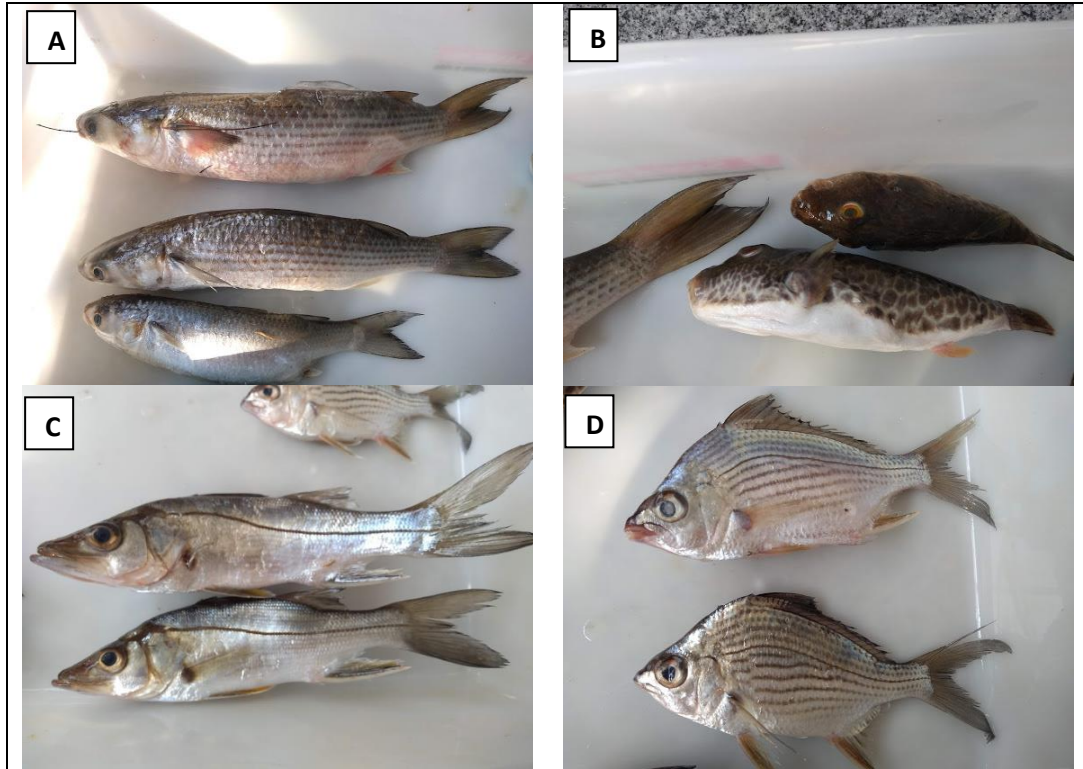
Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

No ponto 2, montante do ponto 1, ainda sob influência de salinidade e caracterizado por forte odor de esgoto, foram coletados 20 caranguejos chama-maré (*Uca sp.*). No ponto 3, sem nenhuma influência de salinidade e interferência antrópica, foram coletados 10 lambaris (*Astyanax spp*) (Figura 4).

Todas as espécies coletadas foram armazenadas em uma caixa térmica instantes após a sua coleta, a fim de preservar os tecidos do processo de decomposição. Posteriormente, foram encaminhadas ao Laboratório de Toxicologia Ambiental (LABTOX) da Centro de Ciências Agroveterinárias – CAV na UDESC, em Lages/SC. A coleta dos tecidos foi realizado no LABTOX, sendo as brânquias e hepatopâncreas dos siris e

chama marés, enquanto dos peixes foram coletados cérebro, músculo, fígado e brânquias.

Figura 3: Peixes coletados no Ponto 1.



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Figura 4: Chama marés coletados no Ponto 2 e peixes coletados no Ponto 3



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

2.2.2 Atividades enzimáticas

Para a leitura da atividade enzimática, os tecidos foram homogeneizados com um agitador mecânico e tampão fosfato pH 7,0. Após este processo, os tecidos foram mantidos sob refrigeração até a aplicação da metodologia baixo descrita. Para a determinação de cada atividade enzimática, seguindo o protocolo, as amostras foram descongeladas e mantidas sob placas de gelo, de modo a não perder a atividade enzimática. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro emissão ultravioleta, modelo T70+ PG Instruments Ltd.

2.2.2.1 Catalase

Para a determinação da Catalase utilizou-se a metodologia proposta por Beutler (1975). Para a leitura das amostras foram utilizados 1980 μL do meio de reação e 10 μL de amostra e 10 μL de peróxido de hidrogênio, homogeneizado e realizadas 5 leituras a cada 30 segundos a um comprimento de onda de 240nm. A atividade enzimática da catalase é expressa em unidades de H_2O_2 metabolizado por miligrama de proteína (μmol de H_2O_2 metabolizado. min^{-1} . mg de proteína $^{-1}$).

2.2.2.2 Glutathione-S-Transferase

O protocolo proposto por Keen e Jakoby (1976) foi utilizado na determinação da GST. Foram adicionados 1940 μL de solução tampão de fosfato de potássio, 20 μL de glutathione reduzida (GSH) e 20 μL de amostra, em seguida adicionou-se 20 μL de reativo 1-cloro-2,4 dinitrobenzeno CDNB, homogeneizando para iniciar as leituras. Foram realizadas cinco leituras com intervalos de 30 segundos em 340 nm de comprimento de onda. A atividade da GST foi expressa em unidades de CDNB conjugado por miligrama de (nmol CDNB conjugado. min^{-1} . mg de proteína $^{-1}$).

2.2.2.3 Acetilcolinesterase

No protocolo de Ellman et al. (1961), foi realizada a determinação da acetilcolinesterase. Para isso, foram utilizados 1mL de tampão fosfato para 50 µL de reagente de cor (DTNB) adicionados a 50 µL de substrato, iodeto de acetilcolina. Após esse primeiro momento, adiciona-se 20 µL de amostra já homogeneizada e realiza as leituras no espectrofotômetro, com comprimento de onda de 412 nm. A atividade da enzima foi expressa em unidades de ACh por miligrama de proteína ($\mu\text{mol de ACh hidrolisada mg de proteína}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$).

2.2.2.4 Proteínas totais

Para a determinação das proteínas totais, foram utilizados 2,5 mL de reagente de biureto, 50 µL de amostra, 50 µL de solução padrão, de albumina bovina estabilizada, e 2 gotas de hidróxido de sódio 6M. A mistura foi homogeneizada, deixada em repouso por 5 minutos em temperatura ambiente, e em seguida realizada a leitura em espectrofotômetro, em 550 nm.

2.2.2.5 Análise estatística

Todos os procedimentos estatísticos e confecções dos gráficos foram executados com o auxílio do software MS Excel®.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

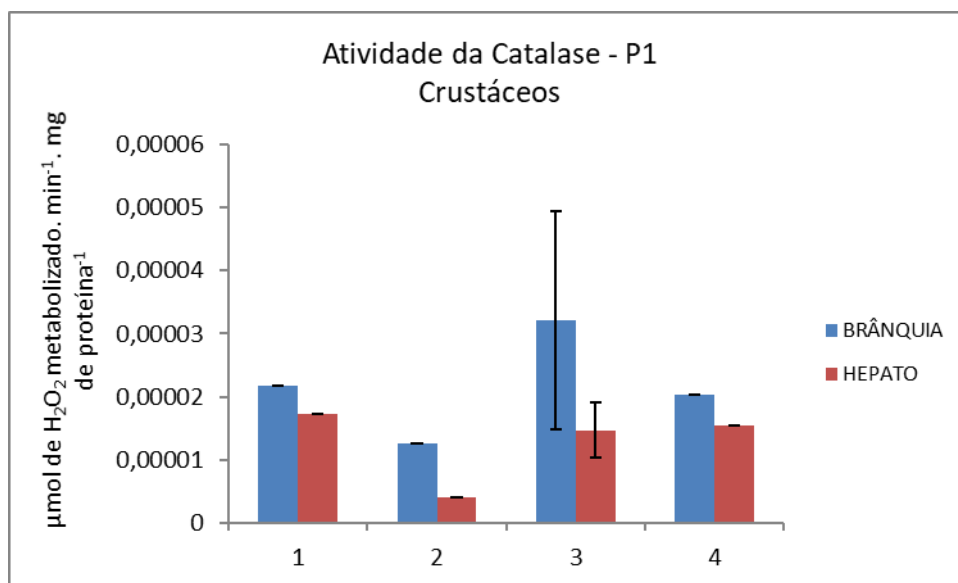
2.3.1 Catalase

A catalase é uma enzima oxidoreductase, a qual desempenha papel crucial na eliminação de espécies reativas de oxigênio (EROS), como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), produzido frequentemente como subproduto

da respiração anaeróbia (KAUSHAL et al., 2018), decompondo-o em água e oxigênio molecular (CAPPARELLI; ABESSA; MCNAMARA, 2016; KRYCHMADEJ; GEBICKA, 2017), aliviando o estresse oxidativo (KAUSHAL et al., 2018).

Avaliando as análises dos tecidos dos crustáceos coletados no Ponto 1, verifica-se, conforme Figura 5, que a atividade da catalase apresentou melhor resposta nas brânquias para todas as espécies analisadas.

Figura 5: Atividade da Catalase em crustáceos coletados no Ponto 1.



Fonte: Elaborado pela autora (2021). Identificação: 1 - Siri azul (*Callinectes sapidus*); 2- Siri vermelho (*Goniopsis cruentata*); 3 - Siri pintado (espécie não identificada) e 4 – siri não identificado.

Todas as espécies tiveram atividade significativa da catalase no fígado, com exceção ao siri vermelho, onde a atividade da catalase encontra-se reduzida.

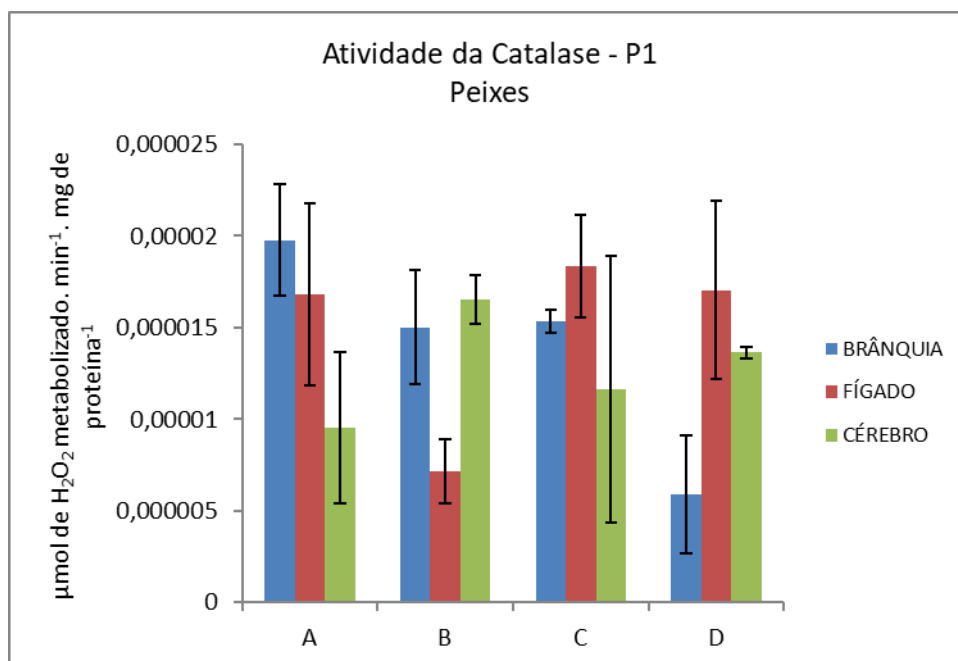
As brânquias dos crustáceos são a conexão entre o ambiente e o organismo, além de ser responsável pela regulação iônica e troca gasosa (FREIRE; ONKEN; MCNAMARA, 2008), sendo assim, é o tecido responsável pelo contato direto com qualquer contaminante existente no ambiente.

Considerando que o Ponto 1 é visivelmente contaminado, pois há o lançamento de efluentes domésticos, além da carga que acompanha o fluxo do rio sentido o mar, a presença da catalase nas brânquias de todas as espécies analisadas, indicam a reação dos organismos a algum estressor.

Em relação aos peixes coletados no Ponto 1 (Figura 6), ambos os tecidos apresentaram atividade significativa para catalase, com exceção ao Baiacu-mirim (*Sphoerodes testudines*) e a Carapeba (*Diapterus auratus*) que apresentaram menor atividade para o fígado e brânquia, respectivamente.

Atli; Canli(2010) menciona que o aumento da atividade da catalase está associado ao sistema de defesa, atuando contra o estresse oxidativo ou compensando a diminuição de outras enzimas antioxidantes.

Figura 6: Atividade da Catalase em peixes coletados no Ponto 1.



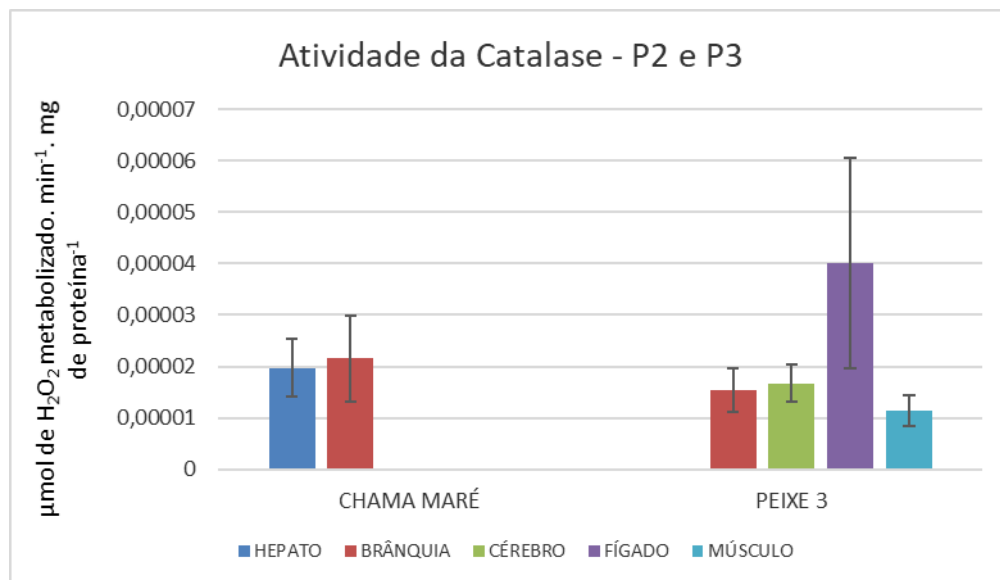
Fonte: Elaborado pela autora (2021). Identificação das espécies: A: Tainha (*Mugil cephalus*), B: Baiacu-mirim (*Sphoerodes testudines*), C: Robalo flecha (*Centropomus palleus*) e D: Carapeba (*Diapterus auratus*)

Oliveira e outros pesquisadores(2019) identificaram a lançamento da água de drenagem proveniente da rizicultura e a contaminação por efluentes domésticos em estudo realizado no Rio Perequê. Os pontos utilizados pelos pesquisadores localizam-se a montante dos pontos utilizados neste estudo, logo os organismos coletados estão sob influência de pesticidas utilizados

no plantio de arroz, além de diversos outros contaminantes presentes nos efluentes domésticos.

No Ponto 2, ambiente notavelmente contaminado por atividades antrópicas, os indivíduos de chama-maré apresentaram atividade semelhante para os dois tecidos analisados para CAT (Figura 7). Sabe-se que em locais com alto grau de poluição os organismos podem apresentar uma certa tolerância aos compostos presentes no meio, sendo capazes de sobreviver nesses ambientes. Este resultado pode indicar que o organismo é capaz de metabolizar os compostos, sem alterar significativamente o funcionamento de suas enzimas.

Figura 7: Atividade da Catalase para caranguejos Chama-maré coletados no Ponto 2 e peixes coletados no Ponto 3.



Fonte: Elaborado pela autora (2021)

Já os peixes coletados no Ponto 3, apresentaram aumento da enzima para o fígado, mantendo-se semelhante para brânquia, cérebro e músculo, de acordo com a gráfico representado na Figura 7.

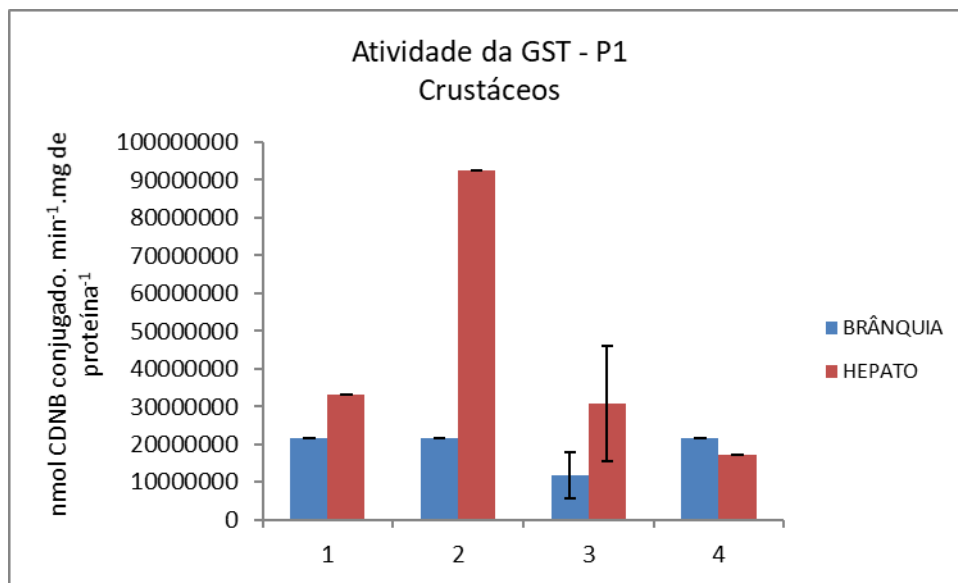
Apesar de o Ponto 3, caracterizar-se por ser o ambiente natural e sem influência antrópica, os indivíduos de *Astyanax spp* apresentaram aumento da catalase no fígado.

2.3.2 Glutationa-s-transferase

A GST é uma proteína envolvida no processo de detoxificação celular e dos efeitos causados por poluentes ambientais como compostos químicos carcinogênicos, drogas e herbicidas (COGO et al., 2009), produtos farmacêuticos, metais pesados, pesticidas, herbicidas, poluentes orgânicos persistentes (POPs) e hidrocarbonetos poliaromáticos (GLISIC et al., 2015).

Os crustáceos coletados no P1, não apresentaram atividades significativas para GST para brânquias e hepatopâncreas, com exceção ao siri vermelho que apresentou a GST bastante elevada no hepatopâncreas (Figura 8).

Figura 8: Atividade da Glutationa-S-Transferase nos crustáceos coletados no Ponto 1.



Fonte: Elaborado pela autora (2021). Identificação: 1 - Siri azul (*Callinectes sapidus*); 2- Siri vermelho (*Goniopsis cruentata*); 3 - Siri pintado (espécie não identificada) e 4 – siri não identificado.

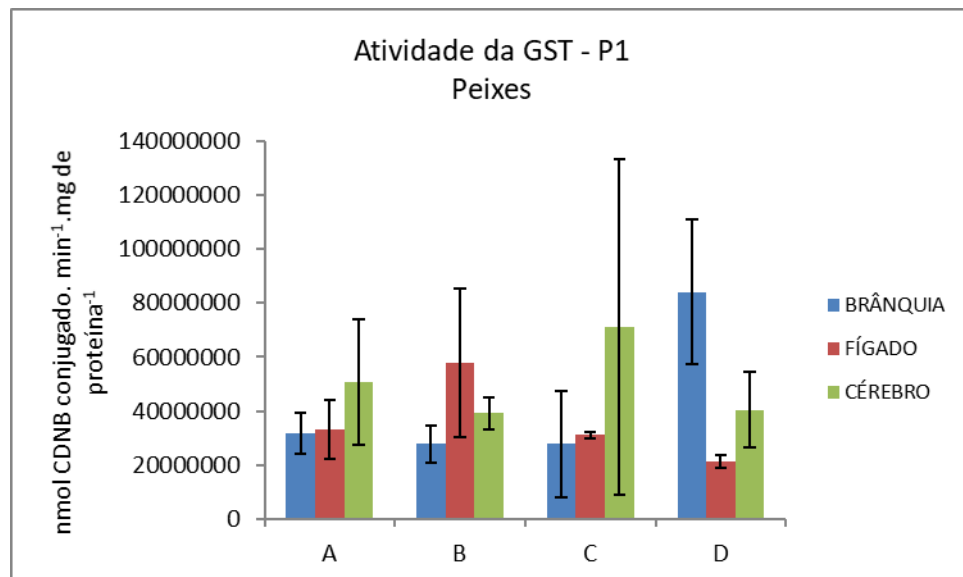
Jesus et al. (2020), em seu estudo realizado com caranguejos da espécie *Ucides cordatus* observou aumento da atividade da GST nas brânquias dos indivíduos coletados nas áreas potencialmente impactadas, quando comparadas a área referência, relacionando esse aumento ao

estresse ambiental e ao esforço para biotransformar os poluente carregados para a região estuarina.

A alta atividade encontrada no hepatopâncreas do siri vermelho, pode indicar que esta espécie seja mais sensível aos contaminantes presentes no local amostrado.

Já a atividade da GST nos peixes coletados no P1 apresentou diferenças de acordo com a espécie. A tainha (*Mugil cephalus*) (Figura 9) apresentaram atividade significativa apenas para o cérebro, assim como o Robalo flecha (*Centropomus pallelus*), apesar do cérebro não ser preparado com defesas antioxidantes (ISLAS-FLORES et al., 2013).

Figura 9: Atividade da Glutationa-S-Transgferase peixes coletados no Ponto 1.



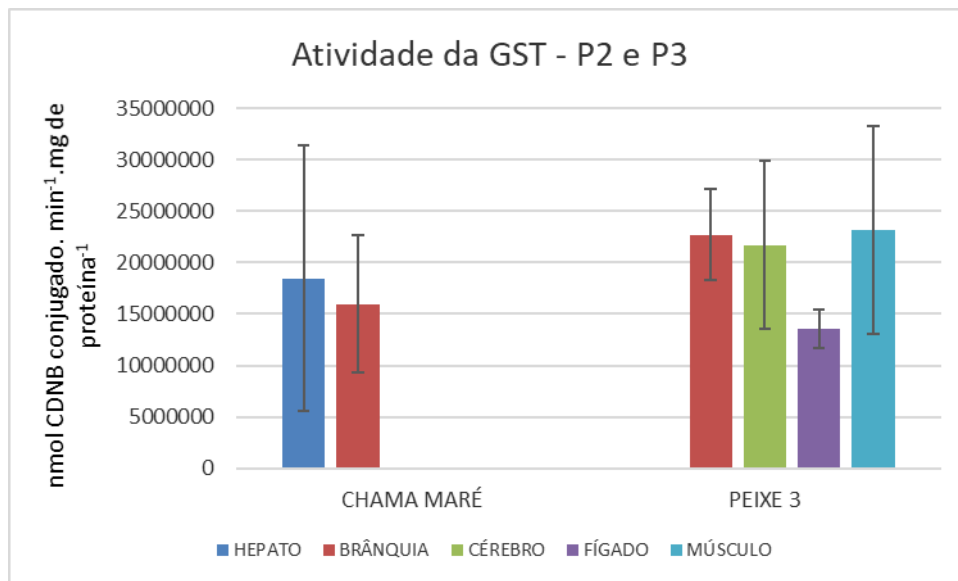
Fonte: Elaborado pela autora (2021). Identificação das espécies: A: Tainha (*Mugil cephalus*), B: Baiacu-mirim (*Sphoerodes testudines*), C: Robalo flecha (*Centropomus pallelus*) e D: Carapeba (*Diapterus auratus*).

O Baiacu-mirim apresentou atividade aumentada para o fígado, o que corrobora com o encontrado em peixes da espécie *Sciades herzbergii*, onde apresentaram aumento da atividade da GST para ambientes com elevadas concentrações de metais como Al, Cd, Pb, Cr, Fe, Hg, indicando o estresse oxidativo gerado por esses compostos (CARVALHO-NETA; ABREU-SILVA, 2013). Sendo assim, é esperado que frente ao estresse

oxidativo o fígado apresenta as mais altas atividades de enzimas antioxidantes (ATLI; CANLI, 2010).

Carapeba (*Diapterus auratus*), por sua vez, apresentou maior atividade da GST para as brânquias. Nos caranguejos chama-maré coletados no P2, não houve atividade significativa da enzima GST.

Figura 10: Atividade da Glutationa-S-Transgferase em caranguejos chama-maré coletados no Ponto 2 e peixes coletados no Ponto 3.



Fonte: Elaborado pela autora (2021)

Já os peixes coletados no Ponto 3, a atividade da GST não teve atividade significativa para brânquias, cérebro e músculo, enquanto o fígado apresentou redução da atividade. Sanches, (2014) evidenciou a redução da GST no fígado de lambaris expostos a 3,4- dichlorofhenylurea (DCPU), contudo a redução não foi interpretada como inibição enzimática, uma vez que em teste *in vitro* essa opção foi descartada, o que levou os pesquisadores a relacionar a redução a um declínio metabólico do organismo.

Outro dado interessante é para os lambaris coletados no Ponto 3, houve um aumento da catalase e redução da GST. Este resultado indica, que mesmo que área coletada aparente ser livre de contaminação, possa ter a presença de uma ou mais substâncias que estão ativando o sistema de defesa antioxidante, fazendo com que a CAT esteja ativada para remover o

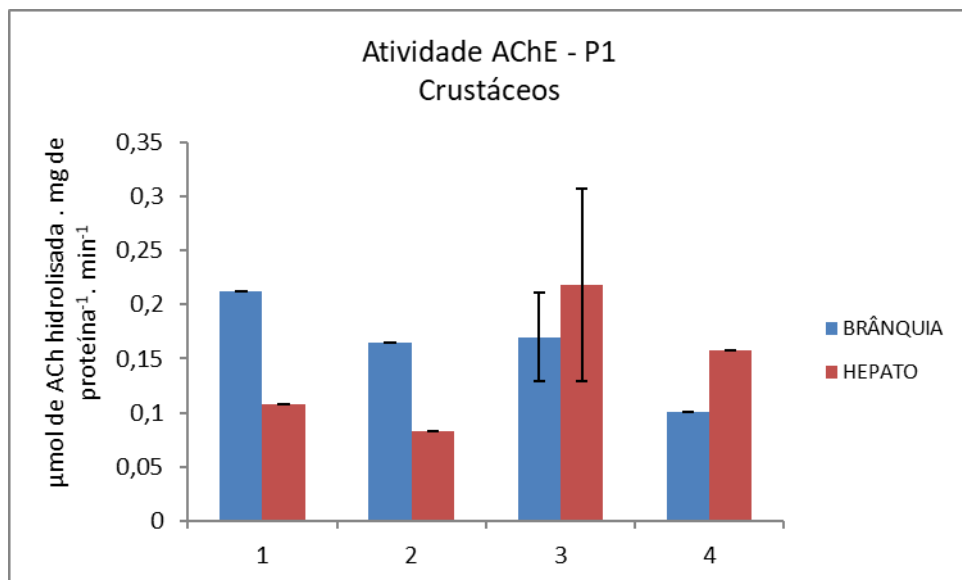
excesso de peróxido de hidrogênio formado. Porém, a GST está com atividade reduzida, indicando que ela pode não estar participando dos processos bioquímicos.

2.3.3 Acetilcolinesterase

A atividade da AChE está associada principalmente ao cérebro e atua como um dos importantes marcadores bioquímicos usados para estudos de toxicidade em meio aquático com animais (KUMAR et al., 2019a). A AChE é responsável por fechar os canais de sódio entre as membranas nervosas. O não fechamento desses canais, pela inibição da AChE, causa um desequilíbrio, gerando distúrbios de ação, com consequente descargas descontroladas e repetitivas nos nervos (WALKER et al., 2006).

Os tecidos analisados dos siris não são os mais relevantes para análise esta enzima, visto que pelos resultados apresentados na Figura 11 não é possível detectar se as variações observadas são distúrbios causados pelos compostos tóxicos presentes na água.

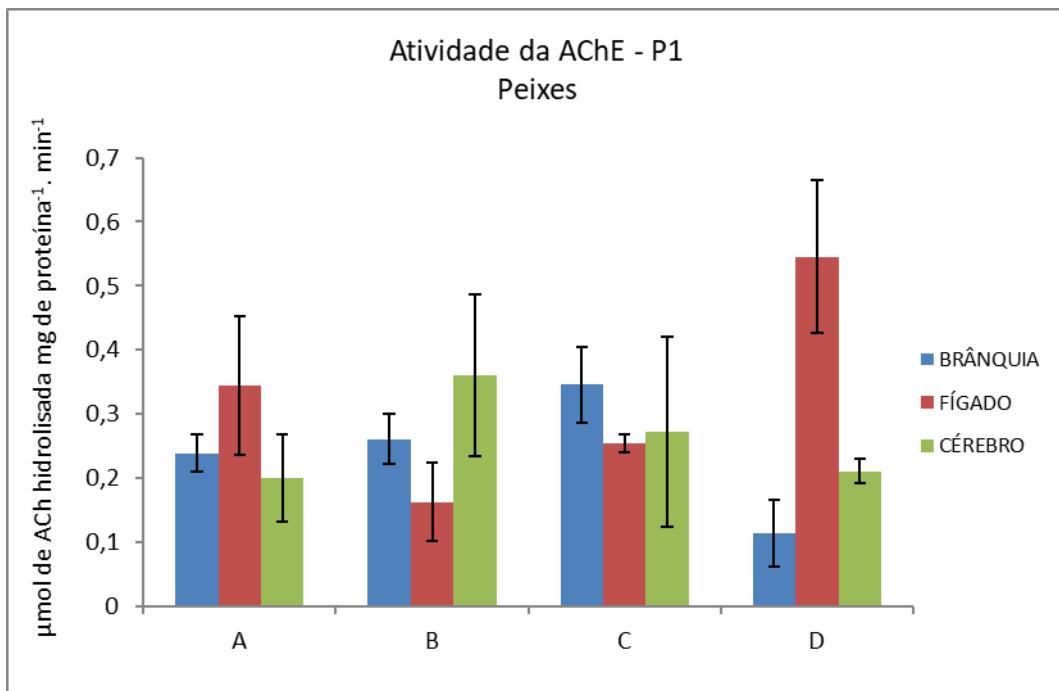
Figura 11: Atividade da Acetilcolinesterase em crustáceos coletados no Ponto 1.



Fonte: Elaborado pela autora (2021). Identificação: 1 - Siri azul (*Callinectes sapidus*); 2- Siri vermelho (*Goniopsis cruentata*); 3 - Siri pintado (espécie não identificada) e 4 – siri não identificado.

Cada espécie de peixe coletados no P1, assim como os crustáceos apresentaram diferentes resultados para a atividade enzimática entre si, sendo que o aumento significativo da atividade da AChE observado ocorreu no fígado da Carapeba (*Diapterus auratus*), bem como os mesmos indivíduos apresentaram a menor atividade nas brânquias (Figura 12).

Figura 12: Atividade da Acetilcolinesterase em peixes coletados no Ponto 1.



Fonte: Elaborado pela autora (2021). Identificação das espécies: A: Tainha (*Mugil cephalus*), B: Baiacu-mirim (*Sphoerodes testudines*), C: Robalo flecha (*Centropomus palleus*) e D: Carapeba (*Diapterus auratus*).

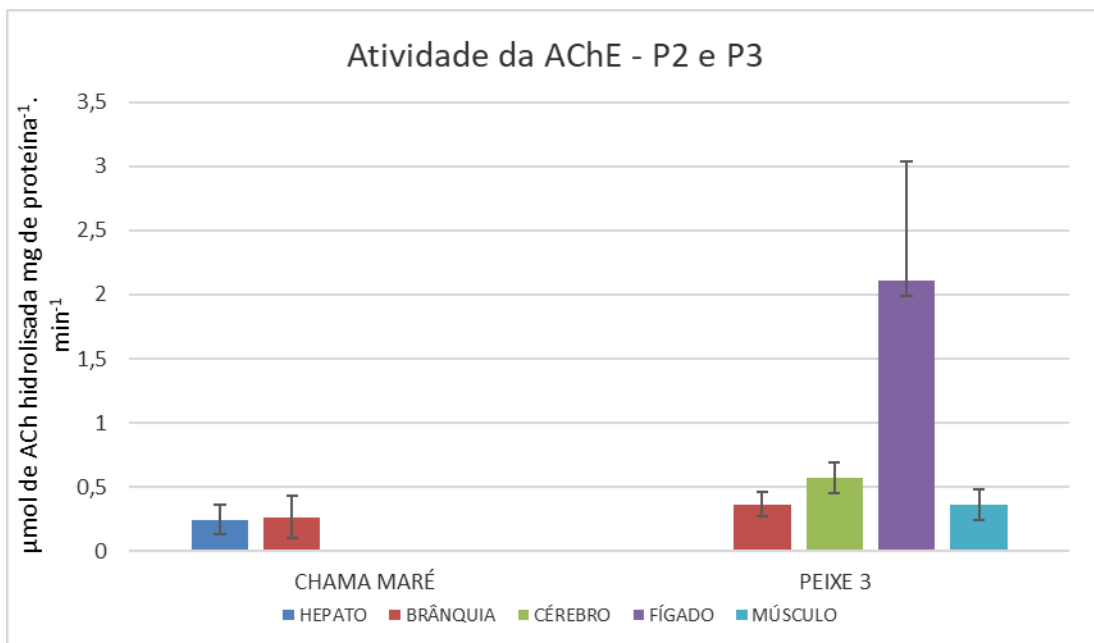
Os peixes da espécie *Mugil cephalus*, não apresentaram atividades significativas para brânquias e cérebro, contudo observa-se uma pequena alteração na atividade da enzima no fígado. O robalo flecha, apresentou pequeno aumento da enzima AChE nas brânquias, enquanto o baiacu-mirim, apresentou atividade normal para as brânquias, redução no fígado e pequeno aumento da no cérebro.

MIRON e colaboradores(2005) identificaram aumento da AChE no cérebro de alevinos de jundiá (*R. quelen*) submetidos a testes com herbicidas utilizados no cultivo de arroz. Os autores interpretaram o aumento

a um efeito toxicológico prejudicial, ou seja, que os animais estão compensando o efeito do estresse, aumentando a AChE. O mesmo pode ser considerado para este estudo, tendo em vista que o Rio Perequê recebe uma carga de defensivos agrícolas utilizados na rizicultura.

Nos caranguejos chama-maré coletados no Ponto 2 observa-se que a atividade da AChE está reduzida para ambos os tecidos coletados (Figura 13). A AChE é considerada o melhor biomarcador para inseticidas organofosforados, por ser o principal alvo (ESTÉVEZ; VILANOVA; SOGORB, 2019), gerando a inibição da enzima, causando acúmulo de acetilcolina nas sinapses nervosas e perturbação na função nervosa (WALKER et al., 2006).

Figura 13: Atividade da Acetilcolinesterase dos caranguejos chama-maré coletados no Ponto 2 e peixes coletados no Ponto 3.



Fonte: Elaborado pela autora (2021)

Já os indivíduos coletados no Ponto 3, apresentou aumento da atividade no fígado. Destacando a baixa atividade da AChE no cérebro dos indivíduos.

Nos estudos de Oliveira et al.(2019) no Rio Perequê, a atividade da AChE foi reduzida no cérebro e músculo dos indivíduos de cará (*Geophagus brasiliensis*) coletados no ponto mais próximo a área de cultivo de arroz,

independente da estação avaliada, em relação ao ponto a jusante. Segundo os autores, o resultado se deu pela maior exposição dos indivíduos aos contaminantes naquele ponto. Contudo, o P3 é considerado sem antropização, sem a descarga de efluentes e resíduos da rizicultura que possam justificar a redução da enzima.

2.4. CONCLUSÃO

Este artigo é resultado de um estudo preliminar que compõe o projeto de avaliação e monitoramento do manguezal do Rio Perequê. Devido a Pandemia do Covid 19, as atividades de campo ficaram suspensas por cerca de um ano, o que impossibilitou as coletas sazonais e a realização as análises físico-químicas que complementaríamos o estudo.

Fica evidente que mais coletas precisam ser realizadas, para elucidar os reais efeitos que os contaminantes presentes nos locais de coleta são capazes de realizar, bem como se fazem necessárias análises de água e sedimento afim de identificar os compostos presentes no ambiente.

Percebe-se que nesta etapa preliminar os efeitos observados de modo geral para peixes e crustáceos, indicam a presença de compostos orgânicos e de metais, provenientes principalmente da rizicultura e de efluentes domésticos.

REFERÊNCIAS

ÁGUAS DE ITAPEMA. Levantamento de Lançamentos de Efluentes no Rio Perequê e Rio da Fita. **Plano Nacional de Saneamento Básico de Itapema/SC**, 2013.

ATLI, G.; CANLI, M. Response of antioxidant system of freshwater fish *Oreochromis niloticus* to acute and chronic metal (Cd, Cu, Cr, Zn, Fe) exposures. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, n. 8, p. 1884–1889, 2010.

BEUTLER, E. Red Cell Metabolism: A manual of biochemical methods. Grune & Stratton, New York, 1975.

BLANCO, M. et al. Science of the Total Environment Assessing the environmental quality of sediments from Split coastal area (Croatia) with a battery of cell-based bioassays. 2017.

BRANDÃO, E. JOSÉ. Revista do Curso de Direito O ecossistema manguezal : aspectos ecológicos e jurídicos. v. 1, p. 1–16, 2011.

CAPPARELLI, M. V.; ABESSA, D. M.; MCNAMARA, J. C. Effects of metal contamination in situ on osmoregulation and oxygen consumption in the mudflat fiddler crab *Uca rapax* (Ocypodidae, Brachyura). **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 185–186, p. 102–111, 2016.

CARVALHO-NETA, R. N. F.; ABREU-SILVA, A. L. Glutathione S-Transferase as biomarker in *Sciades herzbergii* (Siluriformes : Ariidae) for environmental monitoring : the case study of São Marcos Glutathion S-Transferasa como biomarcador en *Sciades herzbergii* (Siluriformes : Ariidae) para el monitoreo. v. 41, n. 2, p. 217–225, 2013.

COGO, A. J. D. et al. Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadoras de impactos ambientais Using oxidative stress enzymes as biomarkers in environmental impacts. **Natureza on line**, v. 7, p. 37–42, 2009.

DÍAZ, J. E. S.; LÓPEZ, E. L. Freshwater Fish as Sentinel Organisms: From the Molecular to the Population Level, a Review. **Intech**, v. i, n. tourism, p. 13, 2013.

ELLMAN, G.L.; COUTNEY, K.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharm.** v.7, p.88-95, 1961.

ESTÉVEZ, J.; VILANOVA, E.; SOGORB, M. A. Biomarkers for Testing Toxicity and Monitoring Exposure to Xenobiotics. **Biomarkers in Toxicology**, p. 1165–1174, 2019.

FREIRE, C. A.; ONKEN, H.; MCNAMARA, J. C. A structure – function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs ☆. v. 151, p. 272–304, 2008.

GLISIC, B. et al. Characterization of glutathione-S-transferases in zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic Toxicology**, v. 158, p. 50–62, 2015.

ISLAS-FLORES, H. et al. Diclofenac-induced oxidative stress in brain, liver, gill and blood of common carp (*Cyprinus carpio*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 92, p. 32–38, 2013.

JESUS, W. . et al. Biomarcadores enzimáticos e histológicos em brânquias de *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Brachyura, Ucididae) indicativos de impactos ambientais em uma região portuária do nordeste do Brasil. p. 1413–1423, 2020.

KAUSHAL, J. et al. Catalase enzyme: Application in bioremediation and food industry. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, p. 192–199, 2018.

KEEN, J.H.; HABIG, W.H.; JAKOBI, W.B. Mechanism for the several activities of the glutathione-S-transferase. **Journal of Biology Chemistry**, v.251, p.6183-6188, 1979.

KRYCH-MADEJ, J.; GEBICKA, L. Interactions of nitrite with catalase: Enzyme activity and reaction kinetics studies. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 171, p. 10–17, 2017.

KULKARNI, R.; DEOBAGKAR, D.; ZINJARDE, S. Metals in mangrove ecosystems and associated biota: A global perspective. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 153, n. September 2017, p. 215–228, 2018.

KUMAR, N. et al. Impacts of acute toxicity of arsenic (III) alone and with high temperature on stress biomarkers, immunological status and cellular metabolism in fish. **Aquatic Toxicology**, v. 214, n. June, p. 105233, 2019.

LI, L.; ZHENG, B.; LIU, L. Biomonitoring and bioindicators used for river ecosystems: Definitions, approaches and trends. **Procedia Environmental Sciences**, v. 2, p. 1510–1524, 2010.

MARIN, C. B. et al. Identificação das Ligações Prediais de Esgoto Irregulares ou Clandestinas no Município de Itapema (SC). **Revista DAE**, v. 64, n. 202, p. 6–19, 2016.

MIRON, D. DOS S. et al. Effects of the herbicides clomazone , quinclorac , and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae). v. 61, p. 398–403, 2005.

OLIVEIRA, F. G. DE et al. Toxicological effects of anthropogenic activities in *Geophagus brasiliensis* from a coastal river of southern Brazil: A biomarker approach. **Science of the Total Environment**, v. 667, p. 371–383, 2019.

PINHEIRO, M. A. A. et al. Accumulation of six metals in the mangrove crab *Ucides cordatus* (Crustacea: Ucididae) and its food source, the red mangrove *Rhizophora mangle* (Angiosperma: Rhizophoraceae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 81, p. 114–121, 2012.

PINHO, L.; REIS, A. F. Processo de crescimento urbano-turístico: estudo do Balneário Meia Praia, no município de Itapema [Santa Catarina, Brasil]. **Labor e Engenho**, v. 7, n. 3, p. 142–157, 2013.

SANCHES, A. L. M. Avaliação dos efeitos deletérios do diuron e de seus metabólitos em lambaris (*Astyanax* sp .): testes de toxicidade , marcadores de estresse oxidativo , marcadores genotóxicos e enzimas de biotransformação Avaliação dos efeitos deletérios do diuron e de. 2014.

SIGNORIN, M. et al. Hidrodinâmica e nutrientes inorgânicos dissolvidos no estuário do Rio Perequê, SC. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**, v. 14, n. 2, p. 13, 2010.

SISINNO, C. L. S.; OLIVEIRA-FILHO, E. C. **Princípios da Toxicologia Ambiental**: conceitos e aplicações. Rio de Janeiro: Interciência, 2013.

ZHANG, Z. et al. Copper, zinc, manganese, cadmium and chromium in crabs from the mangrove wetlands in Qi'ao Island, South China: Levels, bioaccumulation and dietary exposure. **Watershed Ecology and the Environment**, 2019.

ZHANG, Z.; XU, X.; SUN, Y. Heavy metal and organic contaminants in mangrove ecosystems of China: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, 2014.

3. EFEITOS DA PROGESTERONA EM BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS NA TILÁPIA DO NILO

RESUMO

Contaminantes emergentes são substâncias nocivas ao meio ambiente, aos organismos aquáticos e à saúde humana. A lista de contaminantes emergentes é vasta, ganhando destaque aos originados das indústrias de fertilizantes e farmacêutica. Esses compostos chegam aos corpos hídricos devido a ineficiência das estações de tratamento de efluentes. Entre os diversos compostos, os hormônios têm gerado grande preocupação devido ao intenso uso pela população feminina, e os efeitos adversos que essas substâncias podem causar sob os organismos aquáticos. Com o objetivo de avaliar os efeitos dos hormônios, peixes da espécie *Oreochromis niloticus* foram expostas as concentrações de 200, 400, 600 e 800 µg/L de progesterona. Foram determinadas as atividades enzimáticas da Catalase e Glutathione-S-Transferase nas brânquias e fígado e a Acetilcolinesterase no cérebro de tilápia do Nilo. Para a catalase, não houve diferença significativa da atividade entre as concentrações e o grupo controle, contudo a maior atividade foi observada na concentração de 600 µg/L tanto para nas brânquias quanto no fígado. No teste realizado constatou-se que a GST não participa do processo de eliminação da progesterona, uma vez que não apresentou diferença significativa entre os tratamentos. Já a Acetilcolinesterase foi inibida proporcionalmente ao aumento da concentração de progesterona, além disso houve a mortalidade de todos os indivíduos submetidos a concentração de 800 µg/L, natação errática e lateralizada nas demais concentrações, indicando efeitos neurológicos da toxicidade da progesterona na tilápia do Nilo.

Palavras-chave: Hormônios. Toxicidade. Efeitos neurológicos.

ABSTRACT

Emerging contaminants are substances that are harmful to the environment, aquatic organisms and human health. The list of emerging contaminants is vast, with emphasis on those originating from the fertilizer and pharmaceutical industries. These compounds reach water bodies due to the inefficiency of effluent treatment plants. Among the various compounds, hormones have generated great concern due to their intense use by the female population, and the adverse effects that these substances can cause on aquatic organisms. In order to evaluate the effects of hormones, fish of the species *Oreochromis niloticus* were exposed to concentrations of 200, 400, 600 and 800 µg/L of progesterone. The enzymatic activities of Catalase and Glutathione-S-Transferase in the gills and liver and Acetylcholinesterase in the brain of Nile tilapia were determined. For catalase, there was no significant difference in activity between the concentrations and the control group, however the highest activity was observed at the concentration of 600 µg/L for both the gills and the liver. In the test performed, it was found that GST does not participate in the process of elimination of progesterone, as it did not show any significant difference between treatments. Acetylcholinesterase was inhibited proportionally to the increase in the concentration of progesterone, in addition there was a mortality of all individuals submitted to a concentration of 800 µg/L, erratic and lateralized swimming in the other concentrations, indicating neurological effects of progesterone toxicity in Nile tilapia

Keywords: Hormones. Toxicity. Neurological effects.

3.1. INTRODUÇÃO

Os contaminantes orgânicos emergentes são um grupo de novas substâncias que não tem limites máximos estabelecidos pela legislação (OMAR et al., 2019; VANDERMEERSCH et al., 2015). Essas substâncias fazem parte do modo de vida moderna e contribuem para a saúde e os elevados padrões de vida dos seres humanos (KÜMMERER, 2011).

São as principais fontes de contaminantes emergentes a indústria farmacêutica, produtos de cuidados pessoais, indústria de fertilizantes, pesticidas, hormônios, antibióticos, surfactantes, adoçantes artificiais, retardadores de chama, drogas ilegais, antibacterianos, compostos por fluorados, solventes de limpeza, adesivos para roupas, almofadas de espuma, pomadas, proteção solar, cosméticos, cuidados de beleza, refeições e bebidas e alimentos embalados (CABEZA et al., 2012; KÜMMERER, 2011).

Esses contaminantes estão associados a diversos tipos de efeitos à saúde humana como câncer de próstata e de mama, perturbação da função da tireóide, alterações no sistema de reprodução e mudanças no neuroendocrinologia, comportamento e metabolismo (OMAR et al., 2019).

O crescente consumo de anticoncepcionais pela população feminina em todo o mundo vem gerando uma nova preocupação ambiental: a contaminação do meio ambiente pelos hormônios sexuais femininos (MACHADO et al., 2014). Além de hormônios sintéticos pela indústria farmacêutica, segundo Machado e seus colaboradores (2014), hormônios como estrogênios e a progesterona são produzidos naturalmente pelo organismo humano e animal.

Após a administração, os hormônios são excretados pelo homem por meio da urina e fezes (FRANÇA et al., 2020; TORRES et al., 2021). Vários organismos excretam diferentes quantidades de hormônios (MACHADO et al., 2014). Os efluentes domésticos com ou sem tratamento lançados em ambientes aquáticos são as fontes mais importantes de hormônios para o meio ambiente, sejam eles sintéticos ou naturais (MACHADO et al., 2014).

Pesquisas têm mostrado que as estações de tratamento de efluentes tradicionais são insuficientes para tratar ou remover substâncias orgânicas

devido a sua estrutura molecular (RATHI; KUMAR; SHOW, 2020; STARLING; AMORIM; LEÃO, 2019), sendo registrada a porcentagem de remoção de apenas 10% (RATHI; KUMAR; SHOW, 2020).

Apesar dos baixos níveis, a detecção desses compostos na água destinada ao abastecimento são uma grande preocupação a saúde e ao meio ambiente (NAIDU et al., 2016; RATHI; KUMAR; SHOW, 2020). A exposição recorrente e crescente desses compostos causa efeitos adversos em organismos aquáticos (BERETTA et al., 2014; FRANÇA et al., 2020), podendo causar vitelogenese, feminização em peixes machos, infertilidade (PIMENTEL et al., 2016; TORRES et al., 2021).

Segundo Omar e seus colaboradores (2019) a bioacumulação e a biomagnificação desses compostos tem sido observado em organismos aquáticos. Peixes são considerados organismos sensíveis as alterações ambientais, dessa forma seu uso no monitoramento e avaliação ambiental tem sido frequente, uma vez que são afetados apenas por fatores químicos, físicos e bióticos, mas também devido as características hidromorfológicas, assim muitas espécies de peixes são adequadas para testes ecotoxicológicos (FRANÇA et al., 2020).

Tendo em vista a presença de hormônios em corpos hídricos em virtude do lançamento de efluente tratados e não tratados, o objetivo deste estudo é verificar, por meio de biomarcadores bioquímicos, a toxicidade da progesterona em peixes da espécie *Oreochromis niloticus*.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Toxicologia Ambiental do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do estado de Santa Catarina (CAV – UDESC), no município de Lages, Santa Catarina.

Os peixes da espécie *Oreochromis niloticus* foram adquiridos de criadouros da região foram mantidos por 6 dias em aquários de 100 L para aclimatação. As tilápias eram alimentadas com ração duas vezes ao dia e trocas de água do aquário eram realizadas diariamente, sendo substituídas em 90%.

Para preparo das soluções de progesterona, os comprimidos foram macerados e dissolvidos em uma solução mãe com concentração de 1,95 mg/L. A partir da solução mãe, foram obtidas as diluições utilizadas no teste.

Após o período de aclimatação foram preparados cinco aquários, com 10 L de água cada e identificados de acordo com a concentração de progesterona a ser administrada, sendo eles controle, 200 µg/L, 400 µg/L, 600 µg/L e 800 µg/L.

Para a realização do experimento, a alimentação dos peixes foi suspensa 24h antes do seu início. Realizou-se, então, o teste de toxicidade estático durante 96h, sem a troca de água e sem alimentação. Após o período de 96h, os peixes foram sacrificados e realizou-se a coleta dos tecidos brânquias, fígado e cérebro dos peixes de cada tratamento.

3.2.1 Atividade enzimática

Para a leitura da atividade enzimática, os tecidos foram homogeneizados com um agitador mecânico e tampão fosfato pH 7,0. Após este processo, os tecidos foram mantidos sob refrigeração até a aplicação da metodologia baixo descrita. Para a determinação de cada atividade enzimática, seguindo o protocolo, as amostras foram descongeladas e mantidas sob placas de gelo, de modo a não perder a atividade enzimática. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro emissão ultravioleta, modelo T70+ PG Instruments Ltd

Nas brânquias e fígado foram realizadas as leituras da atividade enzimática catalase e glutathione S transferase, enquanto no cérebro foi determinada a atividade da acetilcolinesterase.

3.2.1.1 Catalase

Para a determinação da Catalase utilizou-se a metodologia proposta por Beutler (1975).. Para a leitura das amostras foram utilizados 1980 µL do meio de reação e 10 µL de amostra e 10 µL de peróxido de hidrogênio, homogeneizado e realizadas 5 leituras a cada 30 segundos a um

comprimento de onda de 240nm A atividade enzimática da catalase é expressa em unidades de H_2O_2 metabolizado por miligrama de proteína (μmol de H_2O_2 metabolizado. min^{-1} . mg de proteína $^{-1}$).

3.2.1.2 Glutathiona-s-transferase

O protocolo proposto por Keen e Jakoby (1976) foi utilizado na determinação da GST. Foram adicionados 1940 μL de solução tampão de fosfato de potássio, 20 μL de glutathiona reduzida (GSH) e 20 μL de amostra, em seguida adicionou-se 20 μL de reativo 1-cloro-2,4 dinitrobenzeno CDNB, homogeneizando para iniciar as leituras. Foram realizadas cinco leituras com intervalos de 30 segundos em 340 nm de comprimento de onda. A atividade da GST foi expressa em unidades de CDNB conjugado por miligrama de (nmol CDNB conjugado. min^{-1} . mg de proteína $^{-1}$).

3.2.1.3 Acetilcolinesterase

No protocolo de Ellman et al. (1961), foi realizada a determinação da acetilcolinesterase. Para isso, foram utilizados 1mL de tampão fosfato para 50 μL de reagente de cor (DTNB) adicionados a 50 μL de substrato, iodeto de acetilcolina. Após esse primeiro momento, adiciona-se 20 μL de amostra já homogeneizada e realiza as leituras no espectrofotômetro, com comprimento de onda de 412 nm. A atividade da enzima foi expressa em unidades de ACh por miligrama de proteína (μmol de ACh hidrolisada. mg de proteína $^{-1}$. min^{-1}).

3.2.1.4 Proteínas totais

Para a determinação das proteínas totais, foram utilizados 2,5 mL de reagente de biureto, 50 μL de amostra, 50 μL de solução padrão, de albumina bovina estabilizada, e 2 gotas de hidróxido de sódio 6M. A mistura

foi homogeneizada, deixada em repouso por 5 minutos em temperatura ambiente, e em seguida realizada a leitura em espectrofotômetro, em 550 nm.

3.2.1.5 Análise estatística

As análises estatísticas referentes aos resultados das atividades enzimáticas dos biomarcadores das leituras espectrais foram submetidas ao Teste de Levene para averiguar a homogeneidade das variâncias. Subsequentemente, realizou-se a Análise de Variância (ANOVA), o Teste de Dunnett como um complemento para o estudo da análise de variância e verificações de possíveis diferenças entre as amostragens com o grupo controle e posteriormente o Teste de Tukey. Todos os procedimentos estatísticos e confecções dos gráficos foram executados com o auxílio do software MS Excel®.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A pesquisa realizada com *O. niloticus* e progesterona é um teste pioneiro, tendo em vista que os hormônios são considerados contaminantes emergentes e ainda pouco estudados, bem como o efeito dos mesmos em organismos aquáticos, com isso pesquisas envolvendo a progesterona e biomarcadores bioquímicos são escassos na literatura.

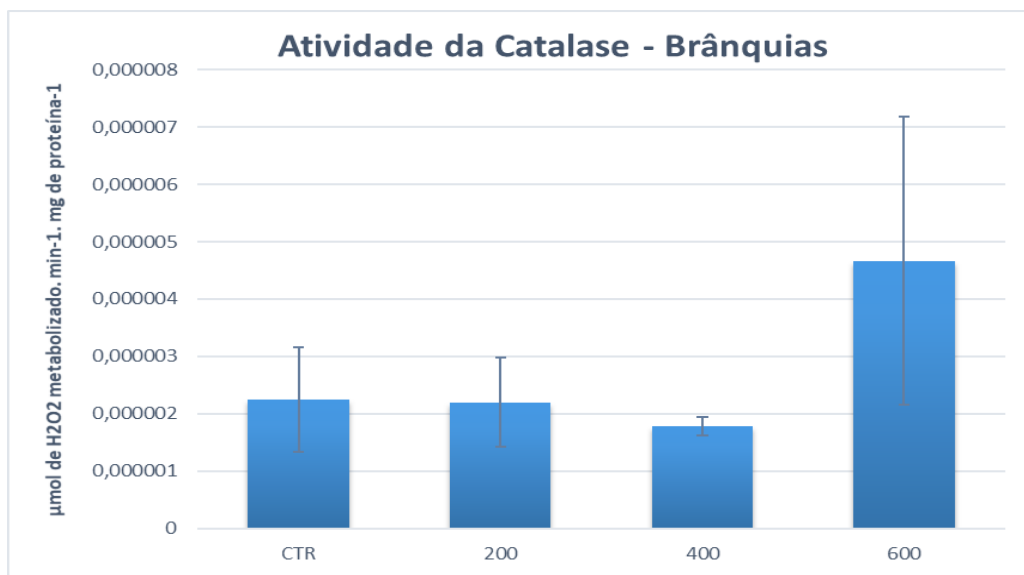
3.2.1 Atividade da Catalase

A catalase é uma enzima oxidoreductase, a qual desempenha papel crucial na eliminação de espécies reativas de oxigênio (EROS), como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), produzido frequentemente como subproduto da respiração anaeróbia (KAUSHAL et al., 2018), decompondo-o em água e oxigênio molecular (CAPPARELLI; ABESSA; MCNAMARA, 2016; KRYCH-

MADEJ; GEBICKA, 2017), aliviando o estresse oxidativo (KAUSHAL et al., 2018).

Nas brânquias a atividade enzimática foi semelhante para os indivíduos controle e aos que foram expostos a 200 µg/L de progesterona (Figura 14), houve redução pouco significativa para o tratamento de 400 µg/L. Já os indivíduos expostos a 600 µg/L houve aumento da atividade.

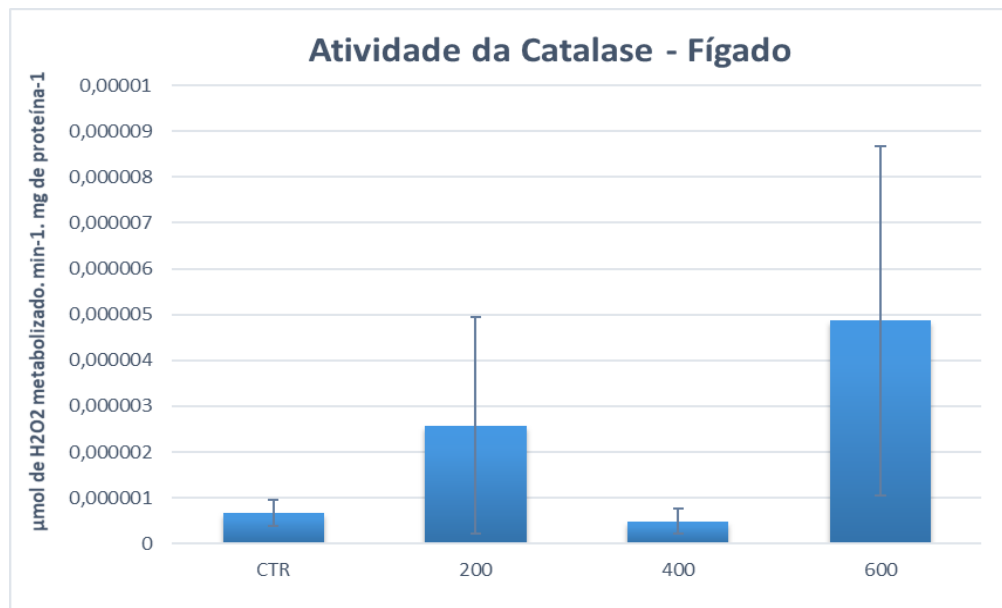
Figura 14: Atividade da Catalase nas brânquias.



Fonte: Elaborado pela autora (2021)

Em relação ao fígado (Figura 15), a atividade da catalase foi reduzida para o controle e concentração de 400 µg/L, enquanto apresentou-se elevada para a teste de 600 µg/L.

Figura 15: Atividade da Catalase no Fígado.



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

O teste estatístico confirmou que não existem diferenças estatisticamente significativas para a CAT nas brânquias ($p=0,09$) e fígado ($p=0,13$), enquanto o Teste de Dunnett relatou uma pequena assimetria entre alguns resultados com o grupo controle em ambos os estudos enzimáticos, confirmada pelo Teste de Tukey.

GOMES e colaboradores(2019) testaram diferentes concentrações dos medicamentos carbamazepina e comazepam e observaram aumento da atividade da catalase no fígado de peixes da espécie *Danio rerio* para ambos os medicamentos, além dos peixes submetidos a combinação dos medicamentos. Indicando que a atividade da catalase aumentada está associada ao sistema de defesa do organismo, indicando que o sistema antioxidante está atuando contra o estresse oxidativo (ATLI; CANLI, 2010), eliminando espécies reativas de oxigênio, como ocorreu com os indivíduos submetidos a concentração de 600 μg/L de progesterona.

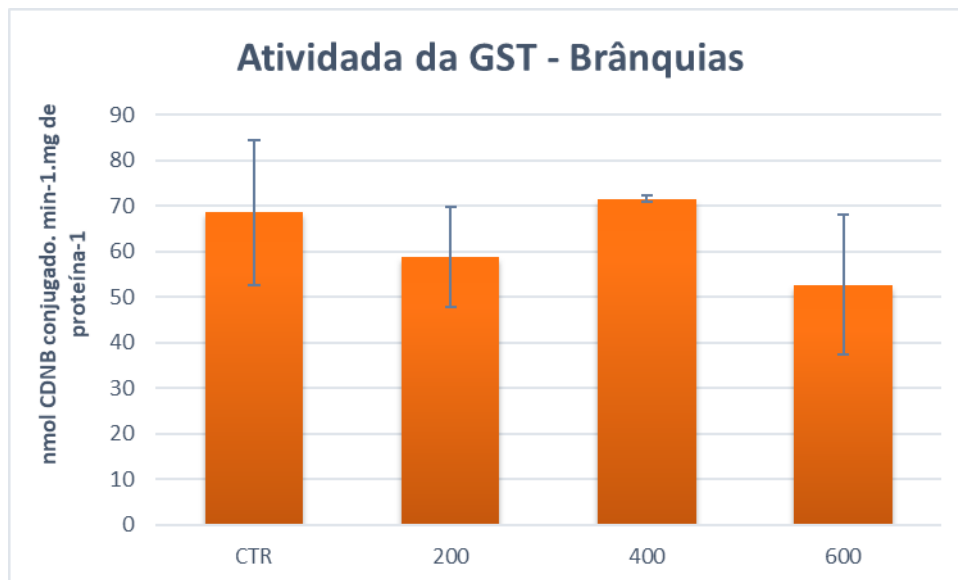
De acordo com TKACHENKO e KURHALUK (2014), o fígado é um órgão com maior potencial antioxidante, seguido das brânquias, cérebro e rins para a determinação do estresse oxidativo (KUMAR et al., 2019a). Sendo assim, é esperado maior atividade enzimática da catalase no fígado.

3.2.2 Atividade da Glutaiona-S-Transferase

A função a da GST é aliviar a toxicidade de diversas substâncias endógenas e exógenas, como os compostos xenobióticos (GLISIC et al., 2015). A conversão ocorre por meio da transformação dos xenobióticos em metabólitos menos tóxicos e mais solúveis em água (BATHIGE et al., 2014).

Os resultados obtidos para GST nas brânquias, indicou que esta enzima não sofreu alteração em função da progesterona, ou seja, não houve alteração significativa em relação ao grupo controle ($p=0,33$). Apesar da GST catalisar a conjugação de diversos compostos estranhos ao organismo, como produtos farmacêuticos, metais pesados, pesticidas, herbicidas, poluentes orgânicos persistentes (POPs) e hidrocarbonetos poliaromáticos (GLISIC et al., 2015), os resultados indicam que a enzima não está atuando em nenhum processo de metabolização e excreção da progesterona (Figura 16).

Figura 16: Atividade da Glutaiona-S-Transferase nas brânquias.

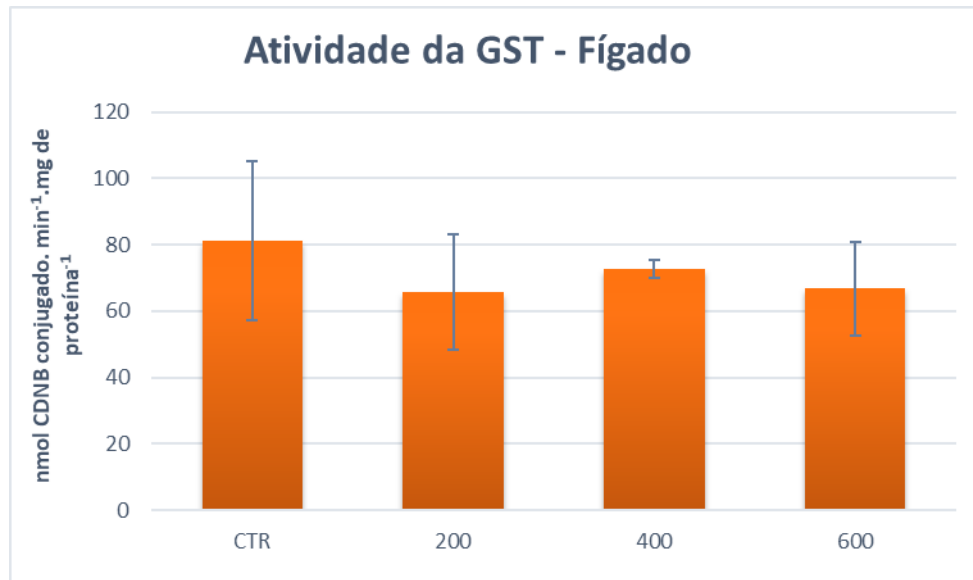


Fonte: Elaborado pela autora (2021)

O mesmo resultado pode ser observado para o fígado ($p=0,18$). Ou seja, a GST é uma enzima que não participa da eliminação da progesterona e nem dos seus metabólitos, sendo que outras enzimas podem estar participando deste processo (Figura 17). Neste caso, se faz necessário mais

estudos, abrangendo outras rotas metabólicas, para que se possa conhecer quais enzimas atuam na metabolização da progesterona e seus derivados no tecido analisado.

Figura 17: Atividade da Glutationa-S-Transferase no fígado.



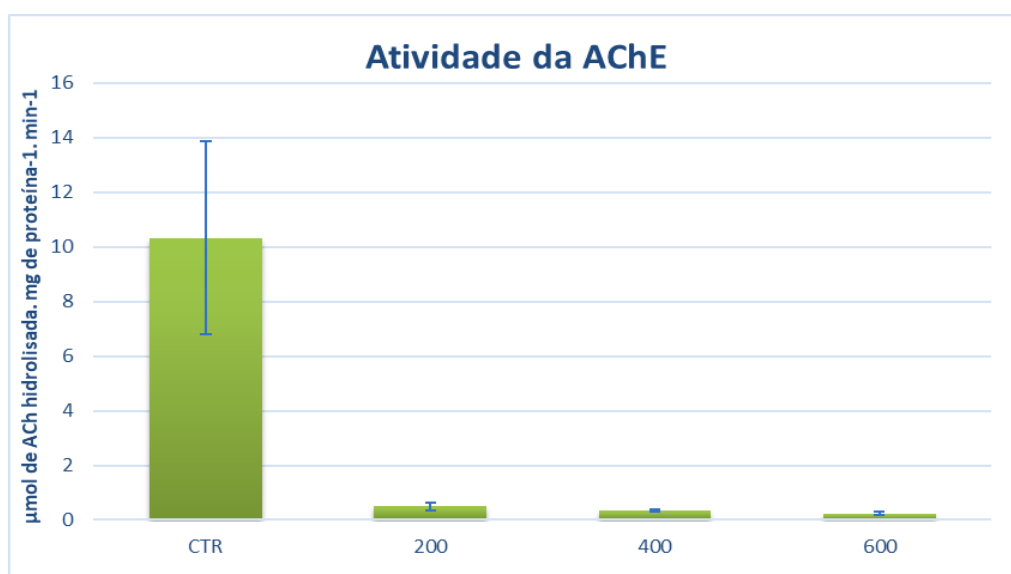
Fonte: Elaborado pela autora (2021)

3.2.3 Atividade da Acetilcolinesterase

A acetilcolinesterase (AChE) é a enzima responsável por hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina (ACh) nas sinapses colinérgicas, nessas sinapses a ACh atua transmitindo a mensagem de um neurônio a outro (ARAÚJO; SANTOS; GONSALVES, 2016). Essa enzima é encontrada em abundância no sistema nervoso central, nos músculos esqueléticos e na membrana dos eritrócitos (ARAÚJO; SANTOS; GONSALVES, 2016).

A análise da AChE do cérebro das Tilápias do Nilo (Figura 18) indica que a progesterona inibiu significativamente a atividade enzimática, ($p=0,00012$). Observa-se que em todos os tratamentos a atividade é reduzida, na medida em que a concentração aumenta. De acordo com pesquisadores, medicamentos (CASTRO et al., 2017), compostos organofosforados e inseticidas carbamatos (WALKER et al., 2006; CASTRO et al., 2017), causam a inibição da AChE.

Figura 18: Atividade da Acetilcolinesterase no cérebro.



Fonte: Elaborado pela autora (2021)

Durante a execução desta pesquisa não foram realizados testes avaliativos, contudo observou-se alterações comportamentais, como natação errática e lateralizada e espasmos musculares, indicando alterações no sistema nervoso das Tilápias do Nilo submetidas aos testes. Além disso, todos os indivíduos de *Oreochromis niloticus* submetidos ao tratamento com 800 μg/L vieram a óbito durante a execução do teste, o que mostra o extremo estresse enfrentado por esses organismos.

A AChE é responsável por fechar os canais de sódio entre as membranas nervosas. O não fechamento desses canais, pela inibição da AChE, causa um desequilíbrio, causando distúrbios de ação, gerando descargas descontroladas e repetitivas nos nervos (WALKER et al., 2006), o que corrobora com o evidenciado durante os testes.

Kumare seus colaboradores(2019) observaram as atividades da AChE inibidas nos testes conduzidos com alevinos *Pangasianodon hypophthalmus* submetidos a arsênio e arsênio combinado com alta temperatura, sendo que a ocorreu maior inibição na exposição simultânea de arsênio e alta temperatura.

Um estudo com Piavas (*Leporinus obtusidens*) submetidas a glifosato por 90 dias, os pesquisadores observaram a inibição da atividade da AChE no cérebro dos indivíduos quando comparado ao controle. Os

pesquisadores justificam a inibição em função do estresse e o aumento dos radicais livres gerados pela exposição a herbicidas (SALBEGO; PRETTO; ROSA, 2010).

De acordo com MILATOVIC; ZAJA-MILATOVIC e GUPTA (2019), o cérebro é bastante susceptível ao dano oxidativo, uma vez que é deficiente em sistemas antioxidantes quando comparado a outros órgãos. Sendo assim, o estresse oxidativo é prejudicial ao funcionamento normal do cérebro (LEE; CHA; LEE, 2020).

Dessa forma, a progesterona utilizada neste estudo, provocou o estresse oxidativo dos indivíduos de *O. niloticus*, causando a inibição da atividade enzimática da AChE, bem como a morte dos indivíduos submetidos a maior concentração testada.

3.4. CONCLUSÃO

A progesterona foi capaz de inibir significativamente a acetilcolinesterase no cérebro dos peixes testados a partir da menor concentração testada 200 µg/L.

No fígado e nas brânquias não houve alterações significativas das atividades da catalase e da GST, indicando que este composto atua diretamente no tecido nervoso das tilápias.

Dessa forma, podemos concluir que a progesterona interfere significativamente em processos do sistema nervoso central, atuando no comportamento da acetilcolinesterase, com conseqüências no comportamento dos peixes testados.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, C. R. M.; SANTOS, V. L. A.; GONSALVES, A. A. Acetylcholinesterase - AChE: A pharmacological interesting enzyme. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 6, p. 1818–1834, 2016.

ATLI, G.; CANLI, M. Response of antioxidant system of freshwater fish *Oreochromis niloticus* to acute and chronic metal (Cd, Cu, Cr, Zn, Fe) exposures. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, n. 8, p. 1884–

1889, 2010.

BATHIGE, S. D. N. K. et al. A mu class glutathione S-transferase from Manila clam *Ruditapes philippinarum* (RpGST μ): Cloning, mRNA expression, and conjugation assays. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 162, n. 1, p. 85–95, 2014.

BERETTA, M. et al. Occurrence of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in marine sediments in the Todos os Santos Bay and the north coast of Salvador , Bahia , Brazil. p. 1278–1286, 2014.

BEUTLER, E. Red Cell Metabolism: A manual of biochemical methods. Grune & Straton, New York, 1975.

CABEZA, Y. et al. Monitoring the occurrence of emerging contaminants in treated wastewater and groundwater between 2008 and 2010. The Baix Llobregat (Barcelona, Spain). **Journal of Hazardous Materials**, v. 239–240, p. 32–39, 2012.

CAPPARELLI, M. V.; ABESSA, D. M.; MCNAMARA, J. C. Effects of metal contamination in situ on osmoregulation and oxygen consumption in the mudflat fiddler crab *Uca rapax* (Ocypodidae, Brachyura). **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 185–186, p. 102–111, 2016.

CASTRO, A. A. DE et al. Organophosphorus degrading enzymes: Molecular basis and perspectives for enzymatic bioremediation of agrochemicals. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 41, n. 5, p. 471–482, 2017.

ELLMAN, G.L.; COUTNEY, K.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharm.** v.7, p.88-95, 1961.

FRANÇA, J. F. DE et al. Determination of 17 α -ethinylestradiol and toxic metals in surface waters, and estimation of daily intake. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 192, n. 1, p. 1–10, 2020.

GLISIC, B. et al. Characterization of glutathione-S-transferases in zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic Toxicology**, v. 158, p. 50–62, 2015.

GOMES, T. B. et al. Sublethal psychotropic pharmaceutical effects on the model organism *Danio rerio*: Oxidative stress and metal dishomeostasis. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 171, n. January, p. 781–789, 2019.

KAUSHAL, J. et al. Catalase enzyme: Application in bioremediation and food industry. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, p. 192–199, 2018.

KEEN, J.H.; HABIG, W.H.; JAKOBI, W.B. Mechanism for the several activities of the glutathione-S-transferase. **Journal of Biology Chemistry**, v.251, p.6183-6188, 1979.

KRYCH-MADEJ, J.; GEBICKA, L. Interactions of nitrite with catalase: Enzyme activity and reaction kinetics studies. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 171, p. 10–17, 2017.

KUMAR, N. et al. Impacts of acute toxicity of arsenic (III) alone and with high temperature on stress biomarkers, immunological status and cellular metabolism in fish. **Aquatic Toxicology**, v. 214, n. June, p. 105233, 2019a.

KUMAR, S. et al. Trace metals contamination in different compartments of the Sundarbans mangrove: A review. **Marine Pollution Bulletin**, v. 148, n. August, p. 47–60, 2019b.

KÜMMERER, K. Emerging Contaminants. **Treatise on Water Science**, v. 3, p. 69–87, 2011.

LEE, K. H.; CHA, M.; LEE, B. H. Neuroprotective Effect of Antioxidants in the Brain. p. 1–29, 2020.

MACHADO, K. S. et al. Ocorrência de hormônios sexuais femininos na bacia do Rio Iguaçu, Curitiba, Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum - Technology**, v. 36, n. 3, p. 421–427, 2014.

MILATOVIC, D.; ZAJA-MILATOVIC, S.; GUPTA, R. C. **Biomarkers of Oxidative/Nitrosative Stress and Neurotoxicity**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019.
NAIDU, R. et al. Emerging contaminants in the environment: Risk-based analysis for better management. **Chemosphere**, v. 154, p. 350–357, 2016.

OMAR, T. F. T. et al. Occurrence and level of emerging organic contaminant in fish and mollusk from Klang River estuary, Malaysia and assessment on human health risk. **Environmental Pollution**, v. 248, p. 763–773, 2019.

PIMENTEL, M. F. et al. Endocrine disruption in *Sphoeroides testudineus* tissues and sediments highlights contamination in a northeastern Brazilian estuary. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 188, n. 5, 2016.

RATHI, B. S.; KUMAR, P. S.; SHOW, P. L. A review on effective removal of emerging contaminants from aquatic systems: Current trends and scope for further research. **Journal of Hazardous Materials**, p. 124413, 2020.

SALBEGO, A.; PRETTO, C.; ROSA, G. Herbicide Formulation with Glyphosate Affects Growth, Acetylcholinesterase Activity, and Metabolic and Hematological Parameters in Piava (*Leporinus obtusidens*). p. 740–745, 2010.

STARLING, M. C. V. M.; AMORIM, C. C.; LEÃO, M. M. D. Occurrence, control and fate of contaminants of emerging concern in environmental

compartments in Brazil. **Journal of Hazardous Materials**, p. 17–36, 2019.

TKACHENKO, H.; KURHALUK, N. Tissue-specific responses of oxidative stress biomarkers and antioxidant defenses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* during a vaccination against furunculosis. 2014.

TORRES, N. H. et al. Environmental aspects of hormones estriol, 17β -estradiol and 17α -ethinylestradiol: Electrochemical processes as next-generation technologies for their removal in water matrices. **Chemosphere**, v. 267, 2021.

VANDERMEERSCH, G. et al. Environmental contaminants of emerging concern in seafood - European database on contaminant levels. **Environmental Research**, v. 143, p. 29–45, 2015.