

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO - UFMA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA - PPGOceano

THAMIRES ALEXSANDRA TORRES

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS NO PEIXE ESTUARINO**  
***Micropogonias furnieri* EXPOSTO AGUDAMENTE AO ANTI-INCRUSTANTE**  
**CLOROTALONIL**

São Luís

2019

THAMIRES ALEXSANDRA TORRES

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS NO PEIXE ESTUARINO**  
***Micropogonias furnieri* EXPOSTO AGUDAMENTE AO ANTI-INCRUSTANTE**  
**CLOROTALONIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Oceanografia – PPGOceano, da Universidade Federal do Maranhão - UFMA, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Oceanografia.

Orientadora: Profª. Dra. Marianna Basso Jorge

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Luvizotto Santos

São Luís

2019

Torres, Thamires Alexsandra.

Avaliação de biomarcadores bioquímicos no peixe estuarino *Micropogonias furnieri* exposto agudamente ao anti-incrustante clorotalonil / Thamires Alexsandra Torres. - 2019.

50 f.

Coorientador(a): Ricardo Luvizotto Santos.

Orientador(a): Marianna Basso Jorge.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Oceanografia/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2019.

1. Acetilcolinesterase (AChE). 2. Clorotalonil. 3. Glutathione s-transferase (GST). 4. Lipoperoxidação (LPO). 5. *Micropogonias furnieri*. I. Basso Jorge, Marianna. II. Luvizotto Santos, Ricardo. III. Título.

**THAMIRES ALEXSANDRA TORRES**

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS NO PEIXE ESTUARINO**  
***Micropogonias furnieri* EXPOSTO AGUDAMENTE AO ANTI-INCRUSTANTE**  
**CLOROTALONIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Oceanografia – PPGOceano, da Universidade Federal do Maranhão - UFMA, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Oceanografia.

Aprovada em 17 de abril de 2019

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Dr<sup>a</sup>. Marianna Basso Jorge**  
**(Orientadora/UFMA)**

---

**Dr<sup>a</sup>. Raimunda Nonata Fortes Carvalho Neta**  
**(UEMA)**

---

**Dr. Márcio Alberto Geihs**  
**(FURG)**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a esta Universidade e seu corpo docente, pela oportunidade de adquirir conhecimento.

À CAPES e ao FINEP pelo financiamento dado para a pesquisa.

À FAPEMA, pelo estágio concedido para a realização das análises.

Ao Laboratório de Ecotoxicologia (LabEcotox) da UFMA, Laboratório de Ecotoxicologia Aplicada a Organismos Aquáticos (EcoBiotox) da FURG (na pessoa da professora Camila Martins, da Larissa, Fernanda, Regina e Micheli, pela boa recepção, ensinamentos e auxílio durante as análises na FURG) e ao Laboratório de Fisiologia (LeFisio) da UFMA, que foram essenciais para a execução deste trabalho.

A minha professora orientadora, Marianna Basso Jorge, que gentilmente me guiou neste trabalho, acompanhando cada etapa, dando explicações para minhas dúvidas e pela oportunidade concedida para aprender coisas novas.

Ao meu coorientador, Ricardo Luvizotto Santos, pelas correções e contribuições para a realização do trabalho.

Aos meus amigos do LabEcotox, Jacyara, Lis, Ana, Alaine, Débora, Dandan, Karla, Cadija, Will, Daniela, Rômulo e os demais, pelos momentos de trabalho e de risadas.

Aos meus amigos de turma, principalmente Jacyara e Igor, com os quais compartilhei dias de desespero e de descontração.

Às minhas amigas de vida, Bruna, Nathália, Kizze e Ananda, pelas conversas, risadas e principalmente pela torcida positiva para que tudo ocorresse bem.

Ao Matheus Lopes pela companhia, apoio, compreensão e companheirismo nessa jornada.

Agradeço aos meus pais, Aurilene e José Carlos, e a minha tia Aurizélia, por todo auxílio e incentivo dado durante o mestrado.

A Deus, que me deu saúde e força para superar as dificuldades em todos os momentos da minha vida.

E a todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram para que fosse possível a conclusão deste trabalho.

## RESUMO

O desenvolvimento de atividades nas regiões costeiras, tem impactado cada vez mais os ecossistemas aquáticos, causando alterações na qualidade da água através do lançamento contínuo de compostos químicos, como é caso dos biocidas utilizados em tintas anti-incrustantes e em agrotóxicos. A preocupação em relação a esses compostos é que a sua maioria não atinge somente o organismo alvo, ocasionando também alterações biológicas em outros organismos aquáticos. A avaliação dos possíveis efeitos causados pelos contaminantes na biota aquática pode ser feita através de ensaios ecotoxicológicos. No entanto, ferramentas mais conservadoras, como as análises de biomarcadores, podem ser usadas como respostas mais eficientes nos estudos que visam um diagnóstico precoce de impactos à biota. Desta forma, neste trabalho foram avaliadas as respostas bioquímicas, tais como acetilcolinesterase (AChE), glutathione-S-transferase (GST) e lipoperoxidação (LPO) em tecidos específicos do peixe estuarino *Micropogonias furnieri* expostos ao biocida anti-incrustante clorotalonil (C<sub>8</sub>Cl<sub>4</sub>N<sub>2</sub>). Para tanto, os organismos foram expostos via intraperitoneal a duas concentrações de clorotalonil (C1 - 0,35 µg/g e C2 - 3,5 µg/g) além de um grupo controle (C). A atividade enzimática da AChE foi medida no cérebro e no músculo, da GST no fígado e na brânquia e a LPO no músculo, brânquia e fígado (96h após as aplicações). Os resultados demonstraram que a atividade da GST no fígado, não apresentou diferença significativa entre os grupos experimentais (C, C1 e C2), podendo estar relacionada a uma possível depleção dos níveis de GSH e consequente inibição da GST em função de um acúmulo excessivo de clorotalonil neste órgão. Já nas brânquias houve um aumento da atividade enzimática na maior concentração de clorotalonil (C2) que pode estar relacionada a um aumento dos níveis de GSH para detoxificação do clorotalonil nas brânquias. A LPO no fígado e no músculo não apresentou diferenças significativas, possivelmente devido a eficiência das defesas antioxidantes, não havendo alterações. No entanto, nas brânquias houve diminuição da LPO (C2) corroborando com os resultados encontrados para GST, que foi mais elevada em C2. Com relação a AChE, nota-se que há um aumento da atividade no cérebro e no músculo, podendo estar relacionado a um mecanismo de compensação devido ao estresse gerado no organismo. Desta forma, observou-se que o composto causa variações bioquímicas principalmente em parâmetros relacionados ao processo de biotransformação e de respostas neurotóxicas em *M. furnieri*.

**Palavras-chave:** acetilcolinesterase (AChE), lipoperoxidação (LPO), glutathione S-transferase (GST), clorotalonil, *Micropogonias furnieri*.

## ABSTRACT

The development of activities in the coastal regions has impacted aquatic ecosystems more and more, causing changes in water quality through the continuous release of chemical compounds, such as the biocides used in antifouling paints and agrochemicals. The concern regarding these compounds is that most of them do not reach only the target organism, resulting in biological alterations in other aquatic organisms as well. The evaluation of potential effects caused by the contaminants in aquatic biota can be performed through ecotoxicological tests. However, more conservative tools such as biomarker analyzes represent more efficient responses in studies that aim an early diagnosis of biota impacts. Thus, in this study, assessments of the following biochemical responses were performed, such as acetylcholinesterase (AChE), glutathione-S-transferase (GST), etoxiresorufina-desetilase (EROD) and lipoperoxidation (LPO), in specific tissues of the estuarine fish *Micropogonias furnieri* exposed to the biocide anti-fouling chlorothalonil (C<sub>8</sub>Cl<sub>4</sub>N<sub>2</sub>). In order to do, the organisms were exposed via intraperitoneal to two concentrations of chlorothalonil (C1 - 0,35 µg/g and C2 - 3,5 µg/g) in addition to a control group (C). The enzymatic activity of AChE was measured in the brain and muscle, the GST was in the liver and gill, and the LPO was in the muscle, gill, and liver (96h after application). The results showed that the activity of GST in the liver did not present significative difference between the experimental groups (C, C1 and C2), which may be related to a possible depletion of GHS levels and consequent inhibition of GST due to excessive accumulation of chlorothalonil in this organ. In the other hand, in the gills, there was an increase in enzymatic activity in the group exposed to a higher concentration of chlorothalonil (C2) which may be related to an increase of GSH levels for chlorothalonil detoxification in the gills. LPO in the liver and muscle did not presente significative diferences, possibly due to the efficiency of the antioxidant defenses, with no alterations. However, in the gills was a decrease in LPO (C2), corroborating with the results of GST that was higher in C2. Concerning AChE, it is noticed that there is an increase of the activity in the brain and muscle, wich may be related to a compensation mechanism due to stress in the organism. Thus, it was observed that the compound causes biochemical variations mainly in parameters related to the process of biotransformation and neurotoxic responses in *M. furnieri*.

**Keywords:** acetylcholinesterase (AChE), lipoperoxidation (LPO), glutathione-S-transferase (GST), chlorothalonil, *Micropogonias furnieri*.

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO GERAL

- Figura 1.** Processo de bioincrustação: a) parte inicial do fenômeno (da fixação de moléculas químicas ao estabelecimento de organismos maiores); b) resultado final do fenômeno em navios. Fonte: modificado de Agostini, Macedo e Muxagata (2018); ANP (2016) e Marine Link (2018).....12
- Figura 2.** Mecanismo de biotransformação de xenobióticos: a) processo de biotransformação através da ligação com a GSH mediada pela GST; b) Exemplo dos conjugados do clorotalonil com a GSH. Fonte: Arvanitis e Boerth (2001) e Townsend e Tew (2003).....15
- Figura 3.** Distribuição do peixe *Micropogonias furnieri* e sua classificação. Fonte: modificado de Discover Life e Klima Natural.....17

### ARTIGO

- Figura 1.** Atividade da glutathione-S-transferase (GST) no peixe da espécie *Micropogonias furnieri* obtida nos diferentes grupos experimentais (controle – C; 0,35 µg/g de clorotalonil – C1 e 3,5 µg/g de clorotalonil – C2), em tecidos de fígado e brânquias. Os asteriscos indicam médias significativamente diferentes entre si ( $p < 0,05$ ), sendo que os resultados estão expressos na forma de média e erro padrão (n=5).....41
- Figura 2.** Lipoperoxidação (LPO) no peixe da espécie *Micropogonias furnieri* obtida nos diferentes grupos experimentais (controle – C; 0,35 µg/g de clorotalonil – C1 e 3,5 µg/g de clorotalonil – C2), em tecidos de fígado, brânquias e músculo. Os asteriscos indicam médias significativamente diferentes entre si ( $p < 0,05$ ), sendo que os resultados estão expressos na forma de média e erro padrão (n=5).....42
- Figura 3.** Atividade da acetilcolinesterase (AChE) no peixe da espécie *Micropogonias furnieri* obtida nos diferentes grupos experimentais (controle – C; 0,35 µg/g de clorotalonil – C1 e 3,5 µg/g de clorotalonil – C2), em tecidos de cérebro e músculo. Os asteriscos indicam médias significativamente diferentes entre si ( $p < 0,05$ ), sendo que os resultados estão expressos na forma de média e erro padrão (n=5).....43

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AChE – enzima acetilcolinesterase

ACh - acetilcolina

ANOVA – análise de variância

ANTAQ – Agência Nacional de Transportes Aquaviários

AFS - Convenção Internacional sobre Controle de Sistemas Antiincrustantes Danosos em Navios

BHT – hidroxitolueno butilado

CAT – catalase

CDNB – 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno

c-Fos – protooncogene que codifica a proteína Fos

ChAT – colina-acetil-transferase

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

DCOIT – 4,5-dicloro-2-n-octil-3-isotiazolona

DMSO - dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucléico

DTNB – ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico

EROD – enzima etoxiresorufina-O-deetilase

EROS – espécies reativas de oxigênio

ER- $\alpha$  – receptor de estrogênio alfa

GADPH – gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GCL – glutamato cisteína ligase

GP<sub>X</sub> – glutationala peroxidase

GR – glutationala redutase

GSSG – glutationala oxidada

GSH – glutationala em sua forma reduzida

GR – glutationala redutase

GST – enzima glutationala s-transferase

KCl – cloreto de potássio

LPO – lipoperoxidação

MDA - malondialdeído

MMA – Ministério do Meio Ambiente

mRNA – RNA mensageiro

NADPH –  $\beta$ -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

PCBs – bifenilas policloradas

PMSF – fenil metil sulfonil fluoreto

SOD – superóxido dismutase

TBA – ácido 2-tiobarbitúrico

TBARS – método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TBT – tributilestanho

TMP - 1,1,3,3-tetrametoxipropano

TPT – trifenilestanho

USEPA - Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

VACHT – transportador vesicular de acetilcolina

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	11
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	19
<b>2.1 OBJETIVO GERAL</b> .....	19
<b>2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	19
<b>3. ARTIGO:</b> Avaliação de biomarcadores bioquímicos no peixe estuarino <i>Micropogonias furnieri</i> exposto agudamente ao anti-incrustante clorotalonil .....	20
<b>RESUMO</b> .....	21
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	22
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	24
<b>RESULTADOS</b> .....	28
<b>DISCUSSÃO</b> .....	29
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	35
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	35
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	40
<b>FIGURAS</b> .....	41
<b>4. CONCLUSÕES FINAIS</b> .....	44
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	44
<b>ANEXOS</b> .....	50

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Os corpos d'águas são ambientes naturais de elevada relevância para o desenvolvimento da vida no planeta Terra, sendo indispensável para a manutenção dos organismos vivos. Além disso, servem como fonte para o desenvolvimento de diversas atividades econômicas na sociedade, tais como: abastecimento de água para as cidades, lazer, geração de energia, navegação, pesca, aquicultura, irrigação na agricultura, produção industrial, áreas de extração e refino de petróleo, extração mineral e vegetal, obtenção de recursos medicinais, entre outras. No entanto, o uso e ocupação desenfreados desses ambientes associados ao despejo constante de efluentes urbanos, industriais e agrícolas vem contaminando cada vez mais esses ambientes, podendo acarretar na perda de habitats e biodiversidade (Baptista Neto, Wallner-Kerssanach e Patchineelam, 2008; Castello et al., 2015).

Os estuários podem ser definidos como corpos de água costeiro semi-fechado com interligação livre com o oceano aberto, no interior do qual a água do mar é mensuravelmente diluída pela água doce originada da drenagem continental (Cameron e Pritchard, 1963; Pritchard, 1967). Esses ecossistemas desempenham papéis ecológicos importantes, como exportadores de nutrientes e matéria orgânica para águas costeiras adjacentes, área de alimentação, berçário, refúgio, habitats vitais para diversas espécies de importância ecológica e econômica, além de gerarem bens e serviços para comunidades costeiras e ribeirinhas (Clark, 1996; Bastos, Feitosa e Muniz, 2005; Figueiredo et al., 2007).

Dentre os impactos causados na região costeira, a atividade portuária apresenta grande potencial de impacto, decorrentes desde a implantação da infraestrutura até a utilização da mesma para o transporte de cargas (ANTAQ). De acordo com a ANTAQ, os principais fatores causadores de impacto são: a implantação da infraestrutura; os resíduos das embarcações; abastecimento de embarcações, serviços de dragagem, água de lastro; e os principais impactos causados são: alteração da linha de costa, do padrão hidrológico, da dinâmica sedimentar, de áreas naturais costeiras (habitats, ecossistemas), supressão de vegetação, introdução de espécies exóticas e poluição da água, solo e ar.

Com relação à navegação, o estabelecimento de comunidades bioincrustantes em estruturas de barcos e navios torna a superfície dos cascos de embarcações rugosa, aumentando o atrito e o arrasto, dificultando a manobras, diminuindo a velocidade, e como consequência aumentando o consumo de combustível (Da Gama, Pereira e Coutinho, 2009; Martins e Vargas, 2013). Além disso, a incrustação de organismos aos cascos de navios pode acarretar na invasão

de espécies exóticas, podendo causar desequilíbrio ecológico e perda da biodiversidade (Agostini, Macedo e Muxagata, 2018). Outros prejuízos podem ocorrer em instalações fixas como as plataformas e boias, podendo levar a corrosão e reduzir a estabilidade das estruturas (Da Gama, Pereira e Coutinho, 2009; Castro, Westphal e Fillmann, 2011).

Entende-se como bioincrustação (Figura 1), o processo natural de colonização sucessiva feita por bactérias, algas e invertebrados sésseis, sobre estruturas submersas na água que prejudicam o desenvolvimento de atividades no ambiente aquático (Da Gama, Pereira e Coutinho, 2009).

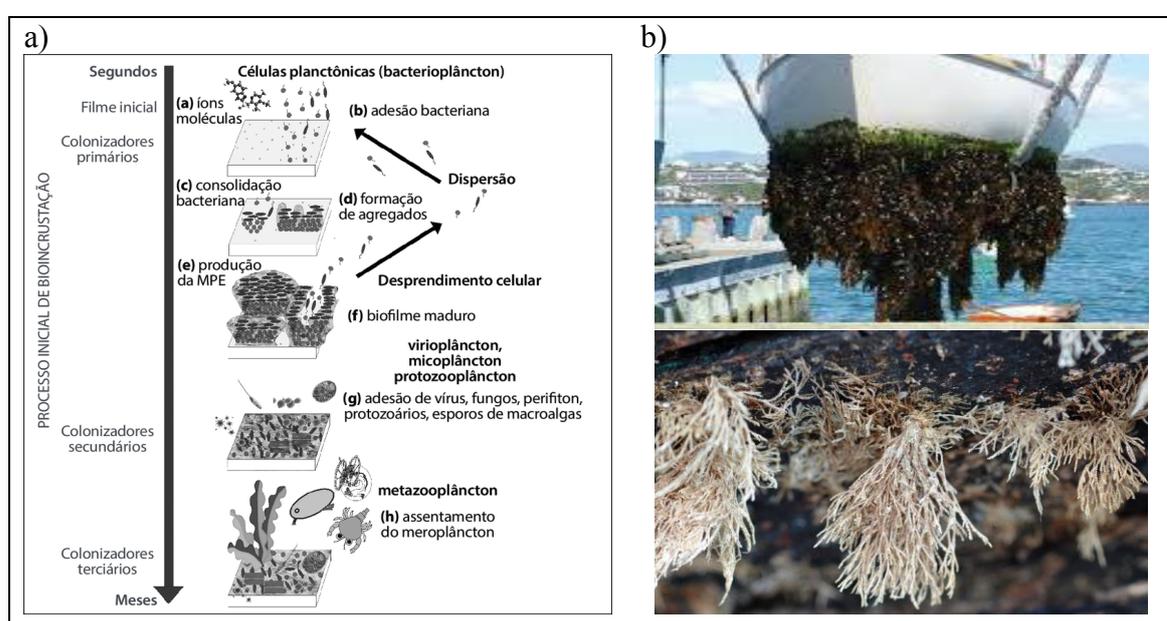


Figura 2. Processo de bioincrustação: a) parte inicial do fenômeno (da fixação de moléculas químicas ao estabelecimento de organismos maiores); b) resultado final do fenômeno em navios. Fonte: modificado de Agostini, Macedo e Muxagata (2018); ANP (2016) e Marine Link (2018).

Diante desta problemática, foram criadas tintas com compostos anti-incrustantes que são aplicadas tanto nas estruturas móveis (barcos e navios), quanto nas estruturas sésseis (plataformas e boias), visando prevenir o processo de bioincrustação (Castro, Westphal e Fillmann, 2011; Martins e Vargas, 2013). Inicialmente, essas tintas foram criadas à base de óxidos de cobre e de zinco (tintas de primeira geração), porém elas não eram duradouras, surgindo a necessidade da criação de um outro tipo de tinta (Castro, Westphal e Fillmann, 2011).

As tintas de segunda geração eram a base de estanho (TBT e TPT). Estas eram eficientes, tinham longa duração, o que era lucrativo, pois diminuía os custos com a

manutenção, porém estudos evidenciaram a elevada toxicidade desses compostos para os organismos aquáticos (Turner, 2010; Castro, Westphal e Fillmann, 2011). Com isso, em 2008 entrou em vigor a convenção AFS, em que se proibiu o uso de tintas à base de compostos organoestânicos, surgindo novamente a necessidade de criação de uma nova composição de tintas (Sonak et al., 2009).

Surgem então, as tintas da terceira geração que são as utilizadas atualmente e apresentam em sua composição cerca de 22 compostos, sendo 14 de origem orgânica não metálica (Busan, Clorotalonil, DCOIT, Diuron, Diclofluanida, Irgarol, Tiram, TMCS Piridina, TPBP Piridina, TCPM, Econe, Capsaicina, Tolifluonida, Densil S-100) e 8 de origem metálica (Cobre Piritona, Maneb, Naftenato de Cobre, Óxido Cuproso, Tiocianato de Cobre, Zinco Piritona, Zineb e Ziram) (Thomas e Brooks, 2010; Castro, Westphal e Fillmann, 2011; Soroldoni et al., 2017). O clorotalonil (2,4,5,6-tetrachloro-1,3-benzenedicarbonitrile) é um fungicida, pertencente ao grupo das cloronitrilas, que além de comporem as tintas anti-incrustantes atuais, são usualmente utilizados para controlar infestações causadas por fungos na agricultura (de frutas, vegetais, plantas ornamentais, etc), podendo chegar também ao ambiente aquático pela dispersão do fungicida, escoamento e erosão do solo (USEPA, 1999).

Devido as características de ser facilmente adsorvido no solo e no sedimento, possuir baixa solubilidade em água (0,6 mg/L) e sofrer rápida degradação, o clorotalonil possui meia vida no ambiente aquático de no máximo 4 semanas (USEPA, 1999; Castro, Westphal e Fillmann, 2011; Van Scoy e Tjeerdema, 2014). No entanto, apesar de não ser uma substância persistente na água, sua entrada no meio é constante e alguns dos seus metabólitos primários, principalmente o 4-hydroxy-2,5,6-trichloroisophthalonitrile, são aparentemente mais persistentes e possuem maior mobilidade do que o clorotalonil, podendo também ser encontrado no ambiente aquático (Van Doorn, Vink e Van Der Poll, 1995; USEPA, 1999). Além disso, o clorotalonil possui Kow relativamente elevado (2,64), lhe conferindo a capacidade de se acumular no sedimento e na biota aquática por ser mais lipofílico (Castro, Westphal e Fillmann, 2011).

Apesar das características do clorotalonil não favorecerem a sua detecção no ambiente aquático e com isso sua concentração no ambiente seja relativamente baixa, recentemente resíduos do composto têm sido encontrados mundialmente em águas superficiais, como o observado por Glinski et al. (2018), que detectou 0,33 µg/L em uma região de agricultura próxima a Tifton (GA-USA) e por Callicott e Hooper-Bùi (2019), que detectaram 33,3 ng/L de clorotalonil em uma região próxima ao Porto Sulphur (MS-USA). Nos Estados Unidos não

estão determinados valores permitidos para o ambiente aquático, já no Canadá essas concentrações são encontradas no Guia de Proteção para Vida Aquática Canadense (Canadian Water Quality Guidelines for the protection of freshwater life - 1999, baseado no Protocolo do Conselho Canadense de Ministros do Meio Ambiente de 1991), em que para água doce a concentração permitida é de 0,18 µg/L, enquanto para água marinha é de 0,36 µg/L. Embora os níveis encontrados geralmente sejam baixos considerando todo o volume de água do sistema, sabe-se que o escoamento de múltiplas fontes pode elevar a sua concentração a níveis tóxicos para os organismos aquáticos (Callicott e Hooper-Bùi, 2019).

Em relação ao mecanismo de ação na biota, sabe-se que clorotalonil possui centros eletrofílicos altamente reativos com as sulfidrilas intracelulares, ligando-se ao grupo sulfidrilas das enzimas, podendo causar diminuição da atividade de enzimas-chaves que atuam na catalisação da glicólise, como a GADPH (Tillman, Siegel e Long, 1975), afetando o processo de respiração celular. Quanto a sua detoxificação, estudos demonstraram que sua presença no organismo induz o aumento da síntese da GSH em fígado e brânquia de peixes (Davies, 1984; Gallagher et al., 1991; Gallagher et al., 1992). A GSH é um antioxidante hidrossolúvel, reconhecido como o tiol não proteico mais importante nos sistemas vivos e também tem papel crucial na detoxificação de diversos xenobióticos orgânicos (Figura 2a), incluindo o clorotalonil. Sua função é transformar, através de sua conjugação via catalisação pela GST, o composto orgânico em moléculas polares (Figura 2b) para posterior excreção (Davies, 1985; Gallagher et al., 1992). Desta forma, os níveis de GSH podem interferir na toxicidade do clorotalonil, por alterar a disponibilidade do composto para se ligar a outras proteínas funcionais (Davies, 1984; Gallagher et al., 1991; Gallagher et al., 1992).

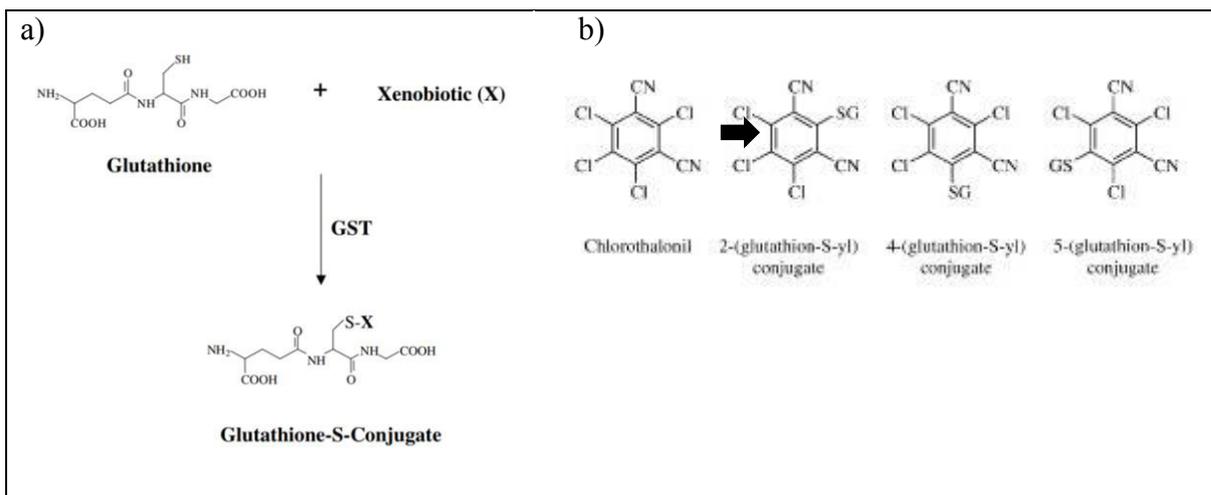


Figura 2. Mecanismo de biotransformação de xenobióticos: a) processo de biotransformação através da ligação com a GSH mediada pela GST; b) Exemplo dos conjugados do clorotalonil com a GSH. Fonte: Arvanitis e Boerth (2001); Townsend e Tew (2003).

Estudos com o clorotalonil vêm sendo realizados para avaliar sua toxicidade em organismos não-alvos. Revisões bibliográficas recentes como a de Amara et al. (2018), mostram os efeitos do clorotalonil em diversos organismos aquáticos, como invertebrados, crustáceos e peixes. Estes estudos ultrapassam décadas e dentre os resultados observados através de testes agudos com peixes, tem-se os de Davies e White (1985), que avaliaram a toxicidade em *Galaxias maculatus* ( $LC_{50}$  de 23,7 e 16,3  $\mu\text{g/L}$  em 24 e 96h, respectivamente), *Galaxias truttaceus* ( $LC_{50}$  de 25,8 e 18,9  $\mu\text{g/L}$  em 48 e 96h, respectivamente) e *Galaxias auratus* ( $LC_{50}$  de 46,6 e 29,2  $\mu\text{g/L}$  em 48 e 96h, respectivamente) e o de Ernst et al. (1991), que avaliou a mortalidade em 96h na espécie *Gasterosteus aculeatus* ( $LC_{50}$  de 27  $\mu\text{g/L}$ ). Outros estudos mais recentes, como os de Bao et al. (2011), observaram mortalidade em larvas da espécie *Oryzias melastigma* ( $LC_{50}$  de 110  $\mu\text{g/L}$ ), após 96h de exposição ao clorotalonil.

Além da mortalidade, outros efeitos do composto foram observados sobre os peixes. Dentre os estudos desenvolvidos tem-se o de Davies (1987), que expôs o peixe *Oncorhynchus mykiss* a 2 $\mu\text{g/L}$  do composto, resultando na redução da capacidade de difusão das brânquias, redução dos níveis de hematócrito no sangue da truta, levando a anemia; o de Sánchez Garayzar et al (2016), que ao exporem peixes de *Danio rerio* ao composto (7 e 35  $\mu\text{g/L}$ ) obtiveram a diminuição da expressão de genes relacionados a imunidade, reprodução, resposta a estresse, alteração na biossíntese da glicose, regulação da célula e detoxificação xenobiótica e o aumento de genes que podem induzir ao dano de DNA. Além do estudo de Castro (2017), realizado simultaneamente a este, com a espécie *M. furnieri* exposta a concentrações de 0,35 e 3,5  $\mu\text{g/g}$

de clorotalonil por 96h, que mostrou que o composto causa danos genotóxicos e mutagênicos na espécie.

Levando em consideração a vulnerabilidade dos ecossistemas aquáticos e a constante entrada de clorotalonil no meio, é necessário avaliar continuamente os efeitos do mesmo na biota. De acordo, com a CONAMA 357 (MMA, 2005), uma das formas de determinar a qualidade da água é através de análises de parâmetros físicos e químicos (temperatura, pH, salinidade, oxigênio dissolvido), nutrientes dissolvidos, metais e alguns compostos orgânicos, como PCBs e hidrocarbonetos. No entanto, essa avaliação não fornece informações reais sobre os efeitos de contaminantes aos organismos aquáticos. Desta forma, torna-se essencial a avaliação dos efeitos de substâncias químicas sobre a biota a fim de proteger a biodiversidade como um todo e fornecer informações mais adequadas para gestão ambiental.

Dentre as metodologias biológicas utilizadas para monitoramento de ambientes aquáticos, destacam-se os biomarcadores, que são respostas biológicas individuais em níveis: bioquímico, fisiológico, histológico ou comportamental, induzidas por xenobióticos presentes no meio (Dos Santos, 2004; Callisto, Gonçalves Jr e Moreno, 2004; Magalhães e Filho, 2008; Pimenta et al., 2016; Danze e Vercellino, 2018). As primeiras respostas biológicas a se manifestarem são as de nível bioquímico celular, podendo ser úteis no processo de gestão de ambientes aquáticos para que a situação não se agrave e atinja níveis irreversíveis, sendo assim consideradas de grande utilidade na prevenção de efeitos deletérios em ecossistemas aquáticos (Amorim, 2003).

Atualmente, os biomarcadores bioquímicos mais utilizados são: (1) a avaliação das enzimas de biotransformação de fase I (EROD) e da fase II (GST); (2) a modulação das defesas antioxidantes celulares acarretando em danos oxidativos como peroxidação lipídica (LPO), carbonilação de proteínas e danos de DNA; (3) efeitos sobre enzimas neurotransmissoras, como a AChE, entre outras (Walker et al., 1997 apud Zagatto e Bertoletti, 2006). Neste contexto, os peixes são amplamente utilizados como organismo-teste por constituírem um importante alimento para a biota aquática e para a população, por serem bem distribuídos ao longo das regiões costeiras e por terem elevada importância ecológica e econômica (Costa e Olivi, 2008). Com isso, diversos estudos têm sido realizados com o *Micropogonias furnieri* como organismo-teste em trabalhos de monitoramento de regiões costeiras. Pesquisas como as de Amado et al. (2006), que avaliaram os biomarcadores bioquímicos GST, LPO e CAT na Lagoa dos Patos, e o de Ventura (2004) que também estudou (CAT; SOD; GST; GPx; GR) no *M. furnieri* no sudeste da costa brasileira (Arraial do Cabo, Baía da Guanabara, Baía de Sepetiba e Angra dos

Reis – RJ; Região de São Sebastião - SP), enfatizam que os peixes representam um importante modelo biológico para a avaliação de contaminantes aquáticos.

O *M. furnieri* (Figura 3; classe Actinopterygii, ordem Perciformes, família Sciaenidae), conhecido popularmente no Brasil como corvina e cururuca no Maranhão, se distribui amplamente na região centro-oeste e sudeste do Atlântico, indo da Península de Yucatán no México até o Golfo de San Matias (Argentina) (Isaac, 1988). No Brasil, pode ser encontrado de Norte ao Sul do país, é uma espécie costeira, estuarina, demersal obrigatória, eurialina e euritermal, ocupando áreas com salinidade de 0,1 a 35 g/kg e temperaturas de 11 a 31,6 °C. Vivem em fundos lamosos e arenosos, e possuem alimentação diversificada (Isaac, 1988; Ventura, 2004), o que justifica sua utilização como organismo-teste para o monitoramento de áreas costeiras.

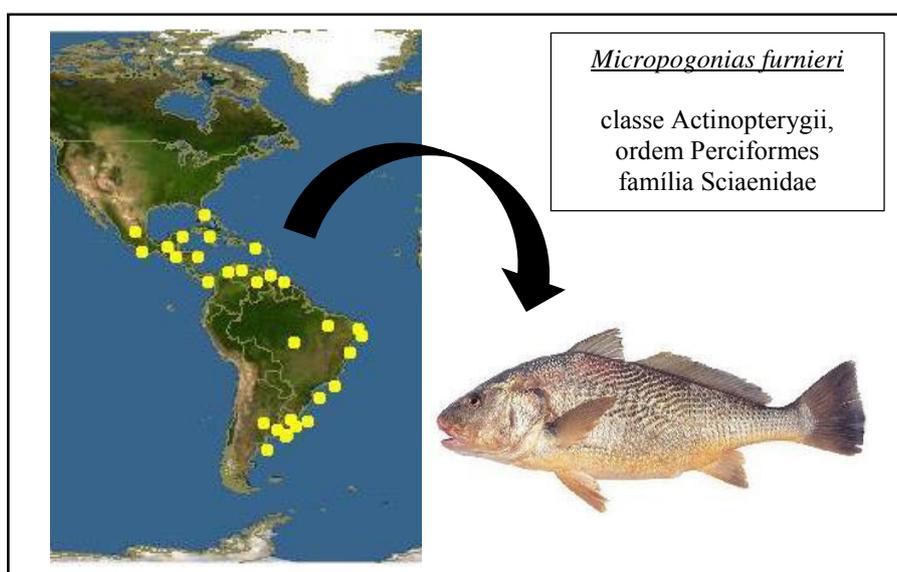


Figura 3. Distribuição do peixe *Micropogonias furnieri* e sua classificação. Fonte: modificado de Discover Life e Klima Naturali.

Considerando o exposto acima, a hipótese do presente estudo visa avaliar se o clorotalonil causa efeitos tóxicos na espécie *Micropogonias furnieri*, a partir de alterações a nível bioquímico celular. Desta forma, essa dissertação tem como objetivo central avaliar o efeito agudo do anti-incrustante clorotalonil no peixe estuarino *Micropogonias furnieri* através da análise de biomarcadores bioquímicos. Para tanto, os organismos foram expostos a diferentes concentrações de Clorotalonil por 96 h para posterior análise da atividade da enzima de

biotransformação GST nas brânquias e fígado, da enzima neurotransmissora AChE em cérebro e músculo, e da concentração de dano lipídico (LPO) em fígado, brânquia e músculo do *M. furnieri*.

Os resultados obtidos no presente estudo estão apresentados e discutidos sob a forma de um artigo científico a ser traduzido e submetido à revista *Marine pollution bulletin*. O referido artigo tem como título “Avaliação de biomarcadores bioquímicos no peixe estuarino *Micropogonias furnieri* exposto agudamente ao anti-incrustante clorotalonil”

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar o efeito agudo do anti-incrustante clorotalonil no peixe estuarino *Micropogonias furnieri* através da análise de biomarcadores bioquímicos.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Analisar a atividade da enzima de biotransformação glutationa-S-transferase (GST) nas brânquias e no fígado do *Micropogonias furnieri* frente a exposição ao Clorotalonil.
- Verificar a neurotoxicidade causada pelo Clorotalonil em cérebro e músculo do *M. furnieri* através da análise da atividade da acetilcolinesterase (AChE).
- Determinar se o Clorotalonil causa danos oxidativos em fígado, brânquia e músculo do *M. furnieri* através da análise da lipoperoxidação (LPO).

### 3. ARTIGO CIENTÍFICO

Avaliação de biomarcadores bioquímicos no peixe estuarino *Micropogonias furnieri* exposto agudamente ao anti-incrustante clorotalonil

Thamires Alexandra Torres<sup>a</sup>, Muryllo Santos Castro<sup>b</sup>, Camila De Martinez Gaspar Martins<sup>e</sup>, Gilberto Fillmann<sup>d</sup>, Ricardo Luvizotto Santos<sup>a,b,c</sup>, Marianna Basso Jorge<sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Oceanografia, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, Brasil.

<sup>b</sup>Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, Brasil.

<sup>c</sup>Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Brasil.

<sup>d</sup>Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brasil.

<sup>e</sup>Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brasil.

## RESUMO

O efeito agudo causado pelo fungicida clorotalonil (2,4,5,6-tetracloroisofalonnitrila) foi avaliado no peixe estuariano *Micropogonias furnieri*, através da análise de biomarcadores bioquímicos: glutatona-S-transferase (GST), lipoperoxidação (LPO) e acetilcolinesterase (AChE). Para isso, juvenis de *M. furnieri* foram expostos por injeção via intraperitoneal da substância de acordo com os grupos experimentais (C – controle com soro fisiológico e DMSO, C1 - 0,35 e C2 - 3,5 µg/g de clorotalonil), por 96h. Os resultados mostram que o clorotalonil induz variações na atividade da GST e da AChE, principalmente na concentração mais elevada, além de possivelmente provocar o aumento das defesas antioxidantes, ocasionando a diminuição dos níveis de LPO. Este estudo auxilia na compreensão dos mecanismos bioquímicos que ocorrem no *M. furnieri* frente a contaminação aguda pelo biocida anti-incrustante clorotalonil, mostrando a sensibilidade dos órgãos e dos processos celulares referentes à biotransformação, estresse oxidativo e sistema de neurotransmissão colinérgica.

**Palavras-chave:** clorotalonil, *Micropogonias furnieri*, acetilcolinesterase (AChE), lipoperoxidação (LPO), Glutaciona s-transferase (GST).

## INTRODUÇÃO

O clorotalonil (2,4,5,6-tetracloroisofталонitrila) é um fungicida, que faz parte das tintas anti-incrustantes atuais e são utilizados para controlar infestações causadas por fungos na agricultura, podendo chegar ao ambiente aquático também pela dispersão de fungicidas, escoamento e erosão do solo (USEPA, 1999). Por ser facilmente adsorvido no solo e no sedimento e pouco solúvel em água (solubilidade de 0,6 mg/L), o clorotalonil não é facilmente detectado na água. Porém, seu Kow (2,64) é relativamente elevado, lhe conferindo a capacidade de se acumular na biota aquática por ser mais lipofílico. Além disso, sua entrada constante no meio pode levar a bioacumulação do mesmo e consequente toxicidade aos organismos aquáticos. (Van Doorn, Vink e Van der Poll, 1995; USEPA, 1999; Castro, Westphal e Fillmann, 2011; Van Scoy e Tjeerdema, 2014).

Apesar das características do clorotalonil não favorecerem a sua detecção no ambiente aquático e com isso sua concentração no ambiente seja relativamente baixa, recentemente resíduos do composto têm sido encontrados mundialmente em águas superficiais, como o observado por Glinski et al. (2018), que detectou 0,33 µg/L em uma região de agricultura próxima a Tifton (GA-USA) e por Callicott e Hooper-Bùi (2019), que detectaram 33,3 ng/L de clorotalonil em uma região próxima ao Porto Sulphur (MS-USA). Nos Estados Unidos não estão determinados valores permitidos para o ambiente aquático, já no Canadá essas concentrações são encontradas no Guia de Proteção para Vida Aquática Canadense (Canadian Water Quality Guidelines for the protection of freshwater life - 1999, baseado no Protocolo do Conselho Canadense de Ministros do Meio Ambiente de 1991), em que para água doce a concentração permitida é de 0,18 µg/L, enquanto para água marinha é de 0,36 µg/L. Embora os níveis encontrados geralmente sejam baixos considerando todo o volume de água do sistema, sabe-se que o escoamento de múltiplas fontes pode elevar a sua concentração a níveis tóxicos para os organismos aquáticos (Callicott e Hooper-Bùi, 2019).

Estudos com o clorotalonil vêm sendo realizados para avaliar sua toxicidade em organismos não-alvos. Revisões bibliográficas recentes como a de Amara et al. (2018), mostram os efeitos do clorotalonil em diversos organismos aquáticos, como invertebrados, crustáceos e peixes. Estes estudos ultrapassam décadas e dentre os resultados observados através de testes agudos com peixes, tem-se os de Davies e White (1985), que avaliaram a toxicidade aguda do composto em *Galaxias maculatus*, *Galaxias truttaceus* e *Galaxias auratus*, obtendo mortalidade e LC50 de 23,7 e 16,3 µg/L (em 24 e 96h, para *G. maculatus*), LC50 de

25,8 e 18,9 µg/L (em 48 e 96h, para *G. trutaceus*) e LC50 de 46,6 e 29,2 µg/L (em 48 e 96h, para *G. auratus*). O de Ernst et al. (1991), que avaliou a mortalidade em 96h na espécie *Gasterosteus aculeatus*, obtendo LC50 de 27 µg/L. Outros estudos mais recentes, como os de Bao et al. (2011), em testes com o clorotalonil com exposição de 96h, observaram mortalidade em larvas da espécie *Oryzias melastigma*, com LC50 de 110 µg/L.

Além de mortalidade, foram observados outros efeitos do composto sobre os peixes, dentre os estudos desenvolvidos tem-se o de Davies (1987), que expôs o peixe *Oncorhynchus mykiss* a 2µg/L do composto, resultando na redução da capacidade de difusão das brânquias, redução dos níveis de hematócrito no sangue da truta, levando a anemia; o de Sánchez Garayzar et al (2016), que ao exporem peixes de *Danio rerio* ao composto (7 e 35 µg/L) obtiveram a diminuição da expressão de genes relacionados a imunidade, reprodução, resposta a estresse, alteração na biossíntese da glicose, regulação da célula e detoxificação xenobiótica e o aumento de genes que podem induzir ao dano de DNA. Além do estudo de Castro (2017), realizado simultaneamente a este, com a espécie *M. furnieri* exposta a concentrações de 0,35 e 3,5 µg/g de clorotalonil por 96h, que mostrou que o composto causa danos genotóxicos e mutagênicos na espécie.

Estudos demonstram que sua presença no organismo induz o aumento da síntese da glutathiona (GSH) em fígado e brânquia de peixes (Davies, 1984; Gallagher et al., 1991; Gallagher et al., 1992). A GSH é um antioxidante hidrossolúvel, sendo o tiol não proteico mais importante nos organismos e também tem papel crucial na detoxificação do clorotalonil através da transformação do composto em uma molécula polar (Davies, 1985; Gallagher et al., 1992), reação que é mediada pela Glutathiona-S-transferase (GST). Desta forma, os níveis de GSH e a atividade da GST podem interferir na toxicidade do clorotalonil, por alterar a disponibilidade do composto para se ligar a outras proteínas funcionais (Davies, 1984; Gallagher et al., 1991; Gallagher et al., 1992).

Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a existência de efeitos a nível bioquímico, em peixes da espécie *M. furnieri*, frente à exposição aguda ao biocida clorotalonil, através da análise de GST, LPO e AChE. O *Micropogonias furnieri* (classe Actinopterygii, ordem Perciformes, família Sciaenidae), se distribui amplamente no Brasil (de Norte ao Sul do país), é uma espécie costeira, demersal obrigatória e possui alimentação diversificada (Isaac, 1988; Ventura, 2004), sendo uma espécie útil como organismo-teste para o monitoramento de áreas costeiras.

## MATERIAL E MÉTODOS

### COLETA DOS ORGANISMOS

Cerca de 60 peixes da espécie *Micropogonias furnieri* foram capturados no município de Raposa (MA), com o auxílio de redes de tarrafa. Os organismos foram transportados para o Laboratório de Ecotoxicologia (LabEcotox) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) em caixa de isopor, preenchida com água do local de coleta e com aeração constante. Ao chegar no laboratório, os peixes passaram por um banho de água doce por 5 min para a remoção de ectoparasitas, antes de serem colocados nos sistemas preparados para aclimação. Durante esse processo, os peixes permaneceram em 4 tanques de polietileno de 310 L, com sistema de filtragem e aeração constante. O período de aclimação foi de 11 dias, em temperatura de 25°C, salinidade de 20 g/kg e fotoperíodo controlado de 12 h claro e 12 h escuro. Os organismos foram alimentados *ad libitum* duas vezes ao dia com camarões, sendo que não foi observada mortalidade durante o período de aclimação.

### ENSAIO DE EXPOSIÇÃO

Após a aclimação, os peixe foram divididos em três grupos experimentais, sendo eles: controle (C) (n experimental de 20 exemplares injetados com soro fisiológico e dimetil sulfóxido - DMSO; com concentração abaixo de 0,01%) e dois grupos de exposição, C1 (n experimental de 20 exemplares injetados com clorotalonil na concentração de 0,35 µg/g, estabelecida de acordo com o fator de bioconcentração do composto para peixes segundo Davies (1988), e C2, (n experimental de 20 exemplares injetados com clorotalonil na concentração de 3,5 µg/g), sendo injetado 1 µL das soluções (de acordo com o tratamento) por grama de peixe. Após a injeção intraperitoneal dos tratamentos, os organismos foram mantidos sem alimentação por mais 96 h nos mesmos tanques de aclimação numa proporção de 1 g de peixe por litro de água, e nas mesmas condições de temperatura salinidade, aeração e fotoperíodo anteriores.

Ao final das 96 h de exposição, os organismos foram eutanasiados por imersão em eugenol (100 mg/L) por cerca de 5 min (Comitê de ética: nº 23115.008075/2016-12), pesados, medidos e dissecados para a retirada dos seguintes tecidos: brânquias, cérebro, fígado e músculo. Os tecidos foram retirados com o auxílio de tesouras e bisturis devidamente higienizados com etanol 90 %, armazenados em tubos do tipo eppendorf de 1,5 mL e destinados

imediatamente ao ultrafreezer (-60 °C) até a homogeneização das amostras para as análises bioquímicas.

#### PREPARO DAS AMOSTRAS PARA AS ANÁLISES BIOQUÍMICAS

As amostras foram descongeladas em gelo, pesadas e homogeneizadas em tampão na proporção de 1:10 (p:v) com o auxílio de um homogeneizador na presença de um inibidor de protease (PMSF-100 mM) de acordo com a quantidade de tampão na amostra (1 µL de solução de PMSF para cada 1 mL de tampão na amostra). Para as análises de GST (Keen, Habig e Jakoby, 1976), amostras de brânquia e fígado foram homogeneizadas com tampão fosfato de potássio (0,1 M - pH 7.2). Para a análise da AChE (Ellman et al., 1961), amostras de cérebro e músculo foram homogeneizadas primeiramente com uma solução de pH 7.4 constituída por tampão fosfato de potássio 0,05 M + glicerol 20 %. Já para LPO, foram homogeneizadas amostras de brânquia, fígado e músculo com tampão de homogeneização de KCl (1,15 %) e BHT (35 µM) (Oakes e Van Der Kraak, 2003).

Após homogeneização para análise de GST as amostras foram centrifugadas a 7500xg (4 °C) por 10 min e o sobrenadante (~200 µL) retirado e armazenado em ultrafreezer a -60 °C até o momento das análises. O homogeneizado dos tecidos para a análise da AChE foi centrifugado a 9000xg (4 °C) por 30 min e o sobrenadante resultante foi identificado como a fração solúvel (FS). Após o armazenamento do sobrenadante, o extrato foi novamente misturado ao tampão (fosfato 0,05 M, glicerol 20 % e triton 0,5 %) na mesma proporção (1:10), e levado para centrifugação a 9000xg (4 °C) por 30 min. O sobrenadante resultante da segunda centrifugação, identificado como a fração de membrana (FM), foi armazenado em ultrafreezer a -60 °C até o momento das análises da AChE. As amostras de LPO foram armazenadas em ultrafreezer a -60 °C logo após a homogeneização até o momento das análises. A concentração de proteínas totais foi realizada em todas as amostras, utilizando-se um kit comercial de reagentes (Bioclin) baseado no método do Biureto.

#### ANÁLISES BIOQUÍMICAS

##### Atividade da GST

A atividade da GST foi determinada nos extratos de brânquia e fígado com base na metodologia descrita por Keen, Habig e Jakoby (1976). O método é baseado na determinação

da GST, a partir do aumento da absorvância a 340 nm devido a formação do conjugado CDNB-GSH, utilizando o CDNB como substrato na presença de GSH, pela técnica de espectrofotometria. O preparo da reação ocorreu em triplicatas, em microplaca transparente (96 poços, fundo chato), com a adição do tampão fosfato de potássio (0,1 M; pH 7.2), da amostra homogeneizada, de CDNB (35 mM) e de GSH (35 mM). A leitura foi feita em leitor de microplaca (FilterMax F5 Multi-Mode Microplate reader), de 15 em 15 s durante 1 min. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína.

#### Avaliação da LPO

A avaliação da LPO foi determinada nos extratos de brânquia, fígado e músculo com base na metodologia TBARS, descrita por Oakes e Van Der Kraak (2003). Os danos por radicais livres em lipídios resultam na produção de MDA, que reage com o TBA, podendo ser medido através da fluorescência (emissão a 532 nm após excitação a 515 nm). Foi estabelecida uma curva padrão com 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP). O preparo da reação ocorreu em quadruplicata, em microplaca branca (96 poços, fundo chato). A leitura foi feita em leitor de microplaca (FilterMax F5 Multi-Mode Microplate reader), de 15 em 15 s durante 1 min. Os resultados foram expressos em nmol MDA/mg de proteína.

#### Atividade da AChE

A avaliação da AChE foi determinada nos extratos de cérebro e músculo com base na metodologia descrita por Ellman et al. (1961). O método é baseado na determinação da taxa de produção de tiocolina, em que o substrato acetilcolina é hidrolisado pela enzima, liberando tiocolina e acetato. A tiocolina reage com o DTNB e esse processo resulta na produção de 5-Tio-2-nitrobenzoato, que emite cor, podendo ser medido pela técnica espectrofotométrica em 412 nm. O preparo da reação ocorreu em triplicata, em microplaca transparente (96 poços, fundo chato), com a adição de solução de tampão fosfato (50 mM; pH 7.4), de DTNB (100 mM), do homogeneizado e de iodeto de acetilcolina (4 mM). A leitura foi feita em leitor de microplaca (FilterMax F5 Multi-Mode Microplate reader), de 15 em 15 s durante 1 min. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}$  de tiocolina/min/mg de proteína.

## ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram submetidos a testes de normalidade e homogeneidade, através do teste de Shapiro-Wilks e de Levene, respectivamente. Após esse procedimento, foram feitos testes de comparação entre os grupos experimentais, sendo utilizado o teste paramétrico ANOVA (como post-hoc o teste de Tukey), para dados normais e homogêneos; ou o teste não paramétrico Kruskal-Wallis (post-hoc o teste de Mann-Whitney com correção de Bonferroni), para dados não normais e não homogêneos. Em ambos os casos foi estabelecido um  $p < 0,05$  de significância.

## RESULTADOS

Os resultados obtidos estão representados na forma de média  $\pm$  erro padrão. A atividade da GST (Figura 1) para as amostras de fígado, nos grupos C, C1 e C2, apresentaram valores médios de  $8,23 \pm 0,84$ ;  $6,34 \pm 1,04$  e  $5,43 \pm 0,78$   $\mu\text{mol CDNB}/\text{min}/\text{mg}$  proteína, respectivamente. De acordo com os resultados, não houve diferenças significativas entre os grupos expostos ao clorotalonil quando comparados ao grupo controle ( $p > 0,05$ ). Para as amostras de brônquias, os valores médios foram de  $2,08 \pm 0,16$ ;  $2,14 \pm 0,26$  e  $4,97 \pm 0,30$   $\mu\text{mol CDNB}/\text{min}/\text{mg}$  proteína, nos grupos C, C1 e C2, respectivamente, havendo diferenças significativas entre o grupo exposto a maior concentração de clorotalonil (C2) e os outros grupos ( $p < 0,05$ ).

A LPO (Figura 2) analisada nos tecidos de fígado, apresentaram médias de  $0,30 \pm 0,03$  (C),  $0,26 \pm 0,08$  (C1) e  $0,32 \pm 0,10$   $\text{nmol MDA}/\text{mg}$  proteína (C2). Conforme os resultados não houve diferenças significativas entre os grupos expostos ao clorotalonil e o controle ( $p > 0,05$ ). Nas brônquias, a LPO apresentou valores médios de  $2,63 \pm 0,35$ ;  $2,39 \pm 0,12$  e  $1,15 \pm 0,15$   $\text{nmol MDA}/\text{mg}$  proteína, para os grupos C, C1 e C2, respectivamente, havendo diferenças significativas do grupo exposto a maior concentração de clorotalonil (C2), com relação ao grupo de menor concentração (C1) e ao controle ( $p < 0,05$ ). No músculo, as médias foram de  $0,88 \pm 0,16$ ;  $0,97 \pm 0,18$  e  $0,67 \pm 0,03$   $\text{nmol MDA}/\text{mg}$  proteína, para os grupos C, C1 e C2, respectivamente. Não houve diferenças significativas entre os grupos expostos ao clorotalonil e o controle ( $p > 0,05$ ).

A atividade da AChE (Figura 3) nos tecidos de cérebro, na fração solúvel (FS), nos grupos C, C1 e C2 tiveram valores médios de  $0,02 \pm 0,00$ ;  $0,06 \pm 0,01$  e  $0,07 \pm 0,00$ ; e na fração de membrana (FM) de  $0,04 \pm 0,00$ ;  $0,08 \pm 0,01$  e  $0,10 \pm 0,02$   $\mu\text{mol tiocolina}/\text{min}/\text{mg}$  proteína, respectivamente. Segundo os resultados obtidos, houve diferenças significativas entre os grupos expostos ao clorotalonil e o controle ( $p < 0,05$ ) tanto na FS, quanto na FM. Nas amostras de músculo, a atividade da AChE na FS foi de  $0,04 \pm 0,01$ ;  $0,05 \pm 0,01$  e  $0,05 \pm 0,01$ , nos grupos C, C1 e C2 respectivamente; e na FM de  $0,04 \pm 0,00$ ;  $0,06 \pm 0,01$  e  $0,07 \pm 0,01$   $\mu\text{mol tiocolina}/\text{min}/\text{mg}$  proteína, nos grupos C, C1 e C2, respectivamente. Os resultados de músculo na FS não apresentaram diferenças significativas entre os grupos expostos ao clorotalonil e o controle, já o na FM teve diferença significativa entre o grupo de maior concentração (C2) e o controle ( $p > 0,05$ ).

## DISCUSSÃO

Diversos estudos vêm indicando os efeitos causados pelo clorotalonil em organismos aquáticos não-alvos. Como exposto anteriormente, com relação aos peixes existem pesquisas que apontam efeitos como: redução da capacidade de difusão das brânquias, dos níveis de hematócrito no sangue da truta e consequente anemia em *Oncorhynchus mykiss* exposto a 2µg/L de clorotalonil (Davies, 1987); perturbações no sistema endócrino atuando como agonista (ativador) do receptor de estrogênio alfa (ER- $\alpha$ ) em *Danio rerio* exposto a 5, 10, 25 e 50 mg/L do composto (Zhang et al., 2016); diminuição da expressão de genes relacionados a imunidade, reprodução, resposta a estresse, alteração na biossíntese da glicose, regulação celular, detoxificação xenobiótica, aumento de genes que podem induzir ao dano de DNA (Sánchez Garayzar et al., 2016) e danos genotóxicos e mutagênicos em *Micropogonias furnieri* sob mesmas condições de exposição deste estudo (Castro, 2017). De acordo com os autores, os resultados obtidos até o momento podem ser explicados pelo modo de ação do clorotalonil, que se baseia na afinidade de ligação com os grupos tióis das proteínas e também por induzir o estresse oxidativo.

Com relação aos biomarcadores analisados neste estudo, sabe-se que a GST é a enzima de biotransformação de fase II mais importante que atua no mecanismo de detoxificação de xenobióticos, através da catalisação da conjugação de diversos substratos eletrofílicos com essas substâncias, visando a sua eliminação da biota (Sheehan et al., 2001). O fígado representa um importante passo na eliminação de compostos químicos, sendo o órgão primário na biotransformação de xenobióticos. Após exposição aguda, ele é o órgão com maior atividade metabólica, tendendo a acumular mais o composto. Com isso, as células neste tecido estão expostas a uma quantidade bem mais elevada dessas substâncias do que os outros órgãos (Heath, 2018).

Sendo assim, a partir dos resultados observa-se que a atividade basal da GST (controle) foi mais elevada no fígado (8,23 µmol CDNB/min/mg proteína) do que nas brânquias (2,08 µmol CDNB/min/mg proteína), por ele ser o principal órgão de metabolização e a principal fonte de GSH e GST em peixes (Santana e Cavalcante, 2016). No presente trabalho a atividade basal da GST no fígado foi 13 vezes mais elevado do que os encontrados por Amado et al. (2006), na mesma espécie coletada em uma região considerada não poluída do estuário da Lagos dos Patos (RS). Essas diferenças basais podem indicar diferenças adaptativas entre as populações da região costeira do Maranhão e Rio Grande do Sul, que podem ter sido desenvolvidas devido as diferenças das condições ambientais naturais em que vivem, tais como

temperatura, salinidade, pH, concentração de oxigênio dissolvido na água, disponibilidade de alimento, entre outras. Os organismos ao detectar alterações físico-químicas no ambiente aquático podem apresentar variações bioquímicas visando manter sua homeostase (Iwama et al., 1999). Entre as duas regiões observa-se grandes diferenças principalmente na temperatura e na salinidade, em que durante o estudo de Amado et al. (2006) ela obteve temperatura de 13°C e salinidade de 11,4 g/kg (no RS), enquanto que na região estuarina do MA a temperatura da água é constantemente elevada e a salinidade varia consideravelmente entre o período chuvoso e de estiagem da região. Outra possibilidade é que essas variações podem ter ocorrido frente a uma maior exposição de contaminantes no ambiente em que vive. Sabe-se que adaptações em genes envolvidos na biotransformação são comumente observadas visando a redução da concentração do composto tóxicos no organismo (Whitehead et al., 2017) e conseqüentemente seus efeitos, fazendo com que essas populações sejam mais resistentes frente ao estresse gerado pela contaminação ambiental.

Além disso, não observamos diferenças significativas da atividade da GST entre o fígado dos organismos controle e dos grupos expostos, mas se observa uma tendência em diminuir a atividade dessa enzima nos grupos com clorotalonil. Estudos como os de Davies (1985), Gallagher et al. (1991) e Gallagher et al. (1992), que avaliaram as concentrações de GSH e sua reação com o clorotalonil mediada pela GST em peixes, indicam que o processo de detoxificação do clorotalonil pode estar em grande parte associado à ligação do composto à GSH, reação que é catalisada pela GST tanto no fígado quanto nas brânquias. Esses autores relatam que é possível que a quantidade de GSH e a atividade da GST sejam os principais fatores que controlam a disponibilidade do clorotalonil e sua toxicidade para peixes.

Tendo em vista que o fígado é o principal órgão de metabolização de xenobióticos, esses resultados podem ser decorrentes de um acúmulo excessivo de clorotalonil neste órgão e uma possível depleção dos níveis de GSH durante a sua metabolização. Barreto et al. (2018) observaram uma diminuição dos níveis de GSH no organismo *Laonereis acuta* exposto a elevada concentração de clorotalonil (100µg/L) e relacionaram esses resultados ao consumo via ligação clorotalonil-GSH. De acordo com os autores, mesmo com o aumento da síntese de GSH (observado pela análise da GCL) não foi observado a manutenção dos níveis de GSH.

Outra possibilidade pode estar relacionada ao processo de manutenção dos níveis de glutathiona em sua forma reduzida (GSH). Quando a GSH participa do processo de redução com espécies oxidantes, ela sofre oxidação (2 GSH formando a glutathiona dissulfeto - GSSG). Para que ocorra o processo de regeneração da GSH, a GSSG é reduzida através da NADPH, gerando

duas moléculas de GSH, processo catalisado pela glutathione redutase (GSR). O clorotalonil pode estar afetando esse processo, pois a manutenção dos níveis de GSH não dependem apenas da sua síntese, mas de todo processo oxidativo intracelular.

Já nas brânquias, pode ter acumulado menos clorotalonil do que no fígado, sendo esse acúmulo suficiente para ativar a GST sem causar a depleção da GSH, havendo diferenças significativas da atividade da GST entre C2 e os outros grupos C e C1, tal qual Gallagher et al. (1992), que observou aumento dos níveis de GSH e da atividade da GST para a detoxificação do clorotalonil em brânquias do peixe *Ictalurus punctatus*. De acordo com Barreto et al. (2018), o clorotalonil induz a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), e o excesso de EROS pode atuar na ativação dos genes responsáveis pelas sínteses de antioxidantes (enzimáticos e não enzimáticos) para evitar o estresse oxidativo. A GSH além de ser importante na detoxificação de compostos orgânicos, também atua na diminuição de EROS, com isso, a indução dos níveis de GSH também pode estar relacionada ao aumento das defesas antioxidantes para combater essas moléculas.

No presente trabalho, os níveis basais de LPO (C) foram mais elevados nas brânquias ( $2,63 \pm 0,35$  nmol MDA/mg proteína), seguido do músculo ( $0,88 \pm 0,16$  nmol MDA/mg proteína) e fígado ( $0,30 \pm 0,03$  nmol MDA/mg proteína). Estes resultados podem estar indicando maior eficiência da atuação de antioxidantes no fígado, que está de acordo com os níveis de GST geralmente encontrados (Fígado > Brânquia). Da Rocha et al. (2009) em estudo com a espécie *M. furnieri* no sudeste do Brasil, obteve uma relação diferente, com maiores valores de LPO no fígado, seguido das brânquias e músculo. Os autores relataram que geralmente há uma ligação entre a LPO e a Capacidade Antioxidante Total (quanto maior a Capacidade Antioxidante Total, maior a eficácia em combater as espécies reativas de oxigênio), porém seus resultados não foram associados a esse parâmetro, pois esse comportamento não foi o observado. Eles relacionaram a maior LPO no fígado a uma possível existência de diferenças na composição dos ácidos graxos insaturados.

Com relação aos grupos experimentais, observa-se que para o fígado e o músculo não houve diferenças significativas entre o grupo controle e os grupos expostos, indicando que o sistema antioxidante ainda consegue atuar de forma eficiente para combater as EROS que geram danos oxidativos aos lipídios. Já, nas brânquias, observa-se um decréscimo significativo da LPO no grupo C2, com relação ao C1 e C, que podem ser justificados pelo aumento da GST e consequente aumento das defesas antioxidantes, processo esse que pode ter sido induzido pela presença de clorotalonil no tecido.

Dados da literatura sugerem que o clorotalonil é capaz de induzir a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (Sánchez Garayzar et al., 2016; Castro, 2017; Barreto et al., 2018), que podem levar ao estresse oxidativo. Sánchez Garayzar et al. (2016), ao exporem peixes de *Danio rerio* ao clorotalonil (7 e 35 µg/L) obtiveram a diminuição da expressão de genes relacionados a imunidade, reprodução, resposta a estresse, alteração na biossíntese da glicose, regulação da célula e detoxificação xenobiótica e o aumento de genes que podem induzir ao dano de DNA. Castro (2017) em experimento realizado simultaneamente ao presente estudo, com *M. furnieri* exposta a concentrações de 0,35 e 3,5 µg/g de clorotalonil por 96h, demonstrou que o composto causa danos genotóxicos e mutagênicos no organismo. Os autores relacionaram os efeitos observados à produção de espécies reativas de oxigênio causada pelo clorotalonil no organismo.

No presente estudo, os resultados de LPO mostram que não houve danos oxidativos nos lipídios, sugerindo que as defesas antioxidantes foram efetivas para resistir a variações que possam causar esse tipo de dano. Estudos indicam que os níveis de GST atuam na redução da LPO, por mediar a ligação de EROS com a GSH e reduzir sua biodisponibilidade para reagir com as membranas celulares (Heise et al., 2003).

A inexistência de danos lipídicos nos organismos expostos ao clorotalonil também pode estar associada ao tipo de EROS gerada em maior quantidade no tecido, pois cada EROS pode agir especificamente em estruturas celulares distintas (proteínas, lipídios e DNA), ou em conjunto (Oliveira e Schoffen, 2010; Silva e Gonçalves, 2010). De acordo com dados reunidos por Silva e Gonçalves (2010), o oxigênio singleto (forma excitada do oxigênio molecular), por exemplo, tem maior afinidade para reagir com os lipídios das membranas causando lipoperoxidação. Já o radical hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ), espécie mais reativa de oxigênio, atua tanto na oxidação de lipídios quanto do DNA, enquanto o superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) atua preferencialmente na oxidação de proteínas e o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) na oxidação de DNA.

A análise da atividade da AChE é comumente utilizada como um biomarcador de contaminação aquática. Seu desempenho é importante para a manutenção em equilíbrio de diversas funções fisiológicas, como orientação para obtenção e captura de alimentos, além da fuga de predadores (Moraes et al., 2007). Se a AChE é inibida e não atua na quebra da ACh, ocorre um acúmulo de ACh nas sinapses, a continua transmissão dos impulsos nervosos e consequente hiperatividade (alterações musculares), asfixia (perda do movimento opercular e modificações natatórias) levando a morte (Perkins e Schlenk, 2000; Guiloski, 2010; Da Silva, 2016). Por outro lado, se a atividade da AChE é aumentada, ocorre o aumento da degradação

da ACh e diminuição da estimulação dos receptores de ACh causando efeito na eficiência da neurotransmissão colinérgica (Tôugu e Kesvatera, 1996; Soreq e Seidman, 2001).

No presente estudo, a atividade basal da AChE no cérebro foi menor do que no músculo (grupo C), mostrando que a enzima está em concentrações diferentes em cada tecido. Uma maior atividade da AChE no músculo comparado com o cérebro também foi observado por estudos de Bretaud, Toutant e Saglio (2000) em *Carassius auratus* (expostos ao pesticida carbofuran) e de Golombieski et al. (2008) em *Aristichthys nobilis* (expostos ao inseticida diafuran), indicando uma diferença na quantidade e taxa de metabolização da enzima de acordo com o órgão. A AChE é uma enzima que tem uma variedade de formas e pode ser encontrada tanto na fração solúvel, quanto na fração de membrana, mas sua maior parte está ligada à membrana celular (Boron e Boulpaep, 2015). No presente estudo, os resultados estão de acordo com essa afirmação, visto que para os dois tecidos, a atividade da AChE foi sempre mais elevada na FM.

Em relação aos grupos experimentais, foi observado um aumento da atividade da AChE com a exposição ao clorotalonil. No cérebro, o aumento foi significativo nas 2 frações, tanto na menor quanto na maior concentração do composto, o que pode ser explicado como um mecanismo secundário de compensação ao estresse causado pelo clorotalonil. De acordo com Kaufer et al. (1998), a inibição da atividade da AChE intermedia duas fases no sistema colinérgico, a fase aguda de hiperexcitação neural decorrente do aumento nos níveis de ACh e a fase secundária de supressão da atividade neural decorrente do aumento da atividade da AChE. Segundo o autor, a hiperexcitação neural causada pela inibição da AChE estimula o aumento dos níveis de RNA mensageiro que codifica o fator de transcrição imediato do gene c-Fos no cérebro que por sua vez pode ativar (AChE mRNA) ou suprimir (ChAT e VAcHT mRNA) a expressão gênica colinérgica. Levando em consideração que os níveis de AChE são controlados positivamente pela interação da ACh com seus receptores, o aumento da sua atividade pode causar um desequilíbrio no sistema colinérgico reduzindo os níveis de ACh e subsequente redução da estimulação dos receptores de ACh (quantidade de ACh versus a de AChE) podendo contribuir para o comprometimento progressivo das funções cognitivas do organismo (Teodorak et al., 2015).

O aumento da atividade da AChE também foi observado por Dey et al. (2016), com as espécies de peixe *Oreochromis niloticus* e *Heteropneustes fossilis*, expostos ao herbicida organofosforado glifosato. Moraes et al (2007), ao estudar o peixe *Rhamdia quelen* também obtiveram um aumento da atividade da AChE em organismos expostos ao pesticida

organofosforado relacionando a um mecanismo de compensação ao estresse a que o organismo estava submetido. O aumento da atividade da AChE também foi observado por Moraes et al. (2007) em *Leoporinus obtusidens* exposto aos compostos orgânicos clomazon, propanil e metilsulforan.

Os resultados do presente estudo, demonstraram efeitos mais expressivos do composto na maior concentração de exposição ao clorotalonil (3,5 µg/g). Os resultados indicaram também que os biomarcadores de contaminação mais eficientes para a espécie foram as alterações na atividade da AChE e da GST, além dos danos de DNA analisados por Castro (2017). Já a LPO não pode ser considerada um bom biomarcador para o *M. furnieri* exposto ao clorotalonil nas condições experimentais utilizadas neste estudo, visto que apesar de ser conhecido pela indução da produção de EROS e de causar danos em DNA por conta dessas moléculas, o clorotalonil não causou danos oxidativos nos lipídios das membranas dos tecidos analisados (fígado, brânquias e músculo), mas sim causou diminuição da LPO na maior concentração de clorotalonil nas brânquias, evidenciando a indução e o funcionamento efetivo dos antioxidantes no tecido.

A análise das alterações da GSH possivelmente representa um biomarcador efetivo para a espécie e deve ser investigada também. Dentre os tecidos analisados, o órgão mais afetado foi o fígado, que apresentou uma tendência a redução na atividade da GST, ainda que não tenha sido uma redução significativa, mostrando que o composto pode atuar no comprometimento da biotransformação de compostos quando acumulado em grandes quantidades no fígado. Outro tecido afetado foi o cérebro, apresentando efeito neurotóxico que foi manifestado através do aumento da atividade da AChE, visto que qualquer desequilíbrio (para mais ou para menos) pode ser indicativo de efeito neurotóxico, sendo prejudicial para funções colinérgicas no organismo. Já as brânquias e o músculo tiveram respostas apenas na maior concentração, sugerindo que o processo de biotransformação no fígado pode evitar que o composto chegue em grandes quantidades nos outros órgãos em baixas concentrações, prevenindo o aparecimento de efeitos tóxicos nesses tecidos para a espécie. Os dados obtidos também reforçam que o composto tem na ligação clorotalonil-GSH, mediada pela GST, seu principal meio de detoxificação.

Desta forma, através dos resultados obtidos no presente estudo, podemos reforçar a conclusão de que o clorotalonil apresenta efeito nocivo para organismos aquáticos, tais como o peixe estuarino *Micropogonias furnieri*, sendo necessária a continuidade de pesquisas com

relação ao efeito deste anti-incrustante na biota aquática para a seleção dos biomarcadores e biomonitores mais efetivos para sua avaliação.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo Edital Ciências do Mar nº43/2013 (projeto CIMAR nº1988/201), à Financiadora de Inovação e Pesquisa – FINEP (projeto CT-Hidro 1111/13 – AIBRASIL2) e à Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão – FAPEMA, pelo Edital de Estágio Nacional nº038/2017, que possibilitaram a realização desta pesquisa.

## **REFERÊNCIAS**

- AMADO, L. L. et al. 2006. Biomarkers in croakers *Micropogonias furnieri* (Teleostei: Sciaenidae) from polluted and non-polluted areas from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil): evidences of genotoxic and immunological effects. *Marine Pollution Bulletin*, v. 52, p. 199-206.
- AMARA, I. et al. 2018. Antifouling processes and toxicity effects of antifouling paints on marine environment. A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 57, p. 115-130.
- BAO, V. W. W. et al. 2011. Acute toxicities of five commonly used antifouling booster biocides to selected subtropical and cosmopolitan marine. *Marine Pollution Bulletin*, v. 62, p. 1147-1151.
- BARRETO, J. S. et al. 2018. Induction of oxidative stress by chlorothalonil in the estuarine polychaete *Laonereis acuta*. *Aquatic Toxicology*, v. 196, p. 1-8.
- BORON, W. F.; BOULPAEP, E. L. 2015. *Fisiologia médica*. 2 ed. Editora Elsevier, Rio de Janeiro, p. 1352.
- BRETAUD, S.; TOUTANT, J. P.; SAGLIO, P. 2000. Effects of carbofuran, diuron, and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 47, n. 2, p. 117-124.

- CALLICOTT, K.; HOOPER-BÙI, L. 2019. An investigation of environmental concentrations of antrazine, chlorothalonil, and fipronil in a Mississippi River-influenced marsh in Southern Louisiana. *Microchemical Journal*, v. 146, p. 1241-1248.
- CASTRO, I. B.; WESTPHAL, E.; FILLMANN, G. 2011. Tintas anti-incrustantes de terceira geração: novos biocidas no ambiente aquático. *Química Nova*, v. 34, n. 6, p. 1021-1031.
- CASTRO, M. S. 2017. Genotoxicidade e mutagenicidade do biocida anti-incrustante clorotalonil na espécie *Micropogonias furnieri*, Desmarest, 1823. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade e Conservação). Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Conservação. p. 47.
- CAUX, P. Y. et al. 1996. Environmental fate and effects of chlorothalonil: A Canadian perspective. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, v. 26, n. 1, p. 45-93.
- COX, C. 1997. Chlorothalonil. *Journal of Pesticide Reform*, v. 17, n. 4, p. 14-20.
- DA ROCHA, A. M. et al. 2009. Seasonal and organ variations in antioxidant capacity, detoxifying competence and oxidative damage in freshwater and estuarine fishes from Southern Brazil. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 150, part C, p. 512-520.
- DA SILVA, L. S. 2016. Inibição de acetilcolinesterase e  $\alpha$ -amilase por extrato das folhas de *Mouriri Elliptica* martius. Dissertação (Mestrado em Agroquímica). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Programa de Pós-Graduação em Agroquímica. p. 64.
- DAVIES, P. E. 1984. Chlorothalonil, its environmental fate, toxicology and metabolism fish. PHD thesis of the requirements for degree of doctor of philosophy, University of Tasmania, Hobart. p. 316.
- DAVIES, P. E.; WHITE, R. W. G. 1985. The toxicology and metabolism of chlorothalonil in fish. I. Lethal levels for *Salmo gairdneri*, *Galaxias maculatus*, *G. truttaceus* and *G. auratus* and the fate of <sup>14</sup>C-TCIN in *S. gairdneri*. *Aquatic Toxicology*, v. 7, p. 93-105.
- DAVIES, P. E. 1985. The toxicology and metabolism of chlorothalonil in fish. II. Glutathione conjugates and protein binding. *Aquatic Toxicology*, v. 7, p. 265-275.
- DAVIES, P. E. 1987. Physiological, anatomic and behavioural changes in the respiratory system of *Salmo gairdneri* rich. On acute and chronic exposure to chlorothalonil. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 88, part C, n. 1, p. 113-119.

- DAVIES, P. E. 1988. Disappearance rates of chlorothalonil (TCIN) in the aquatic environment. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 40, p. 405-409.
- DE LORENZO, M. E.; FULTON, M. H. 2012. Comparative risk assessment of permethrin, chlorothalonil, and diuron to coastal aquatic species. *Marine Pollution Bulletin*, v. 64, p. 1291-1299.
- DEY, B. S. et al. 2016. Effects of four rice herbicides on some metabolic and toxicology parameters of teleost fish (*Leporinus obtusidens*). *Chemosphere*, v. 68, n. 8, p. 1597-1601.
- ELLMAN, G. L. et al. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, v. 7, p. 88-95.
- ERNST, W. et al. 1991. The toxicity of chlorothalonil to aquatic fauna and the impact of its operational use on a pond ecosystem. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 21, p. 1-9.
- GALLAGHER, E. P. et al. 1991. Glutathione-S-transferase-mediated chlorothalonil metabolism in liver and gill subcellular fractions of channel catfish. *Biochemical Pharmacology*, v. 42, n. 1, p. 139-145.
- GALLAGHER, E. P. et al. 1992. The protective role of glutathione in chlorothalonil-induced toxicity to channel catfish. *Aquatic Toxicology*, v. 23, p. 155-168.
- GLINSKI, D. A. et al. 2018. Analysis of pesticides in surface water, stemflow, and throughfall in an agricultural area in South Georgia, USA. *Chemosphere*, v. 209, p. 496-507.
- GOLOMBIESKI, J. I. et al. 2008. Acetylcholinesterase enzyme activity in carp brain and muscle after acute exposure to diafuran. *Science Agriculture*, v. 65, n. 4, p. 304-345.
- GUILOSKI, I. C. et al. 2010. Atividade da colinesterase em cérebro e músculo de *Corydoras paleatus* (Pisces, Teleostei) expostos ao carbaril. *Revista Acadêmica de Ciências Agrárias Ambientais*, v. 8, n. 4, p. 461-468.
- HEATH, A. G. 2018. *Water pollution and fish physiology*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press. p. 384.
- HEISE, K. et al. 2003. Production of reactive oxygen species by isolated mitochondria of the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* (King and Broderip) under heat stress. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 134, part C, p. 79-90.
- ISAAC, V. J. 1988. Synopsis of biological data on the whitemouth croaker, *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823). *FAO fish synopsis*. p. 150.

- IWAMA, G. K. et al. 1999. Heat shock proteins and physiological stress in fish. *American Zoologist*, v. 39, p. 901-909.
- KAUFER, D. et al. 1998. Acute stress facilitates long-lasting changes in cholinergic gene expression. *Nature*, v. 393, p. 373-377.
- KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. 1976. Mechanism for the several activities of the glutathione-S-transferases. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 251, n. 20, p. 6183-6188.
- MORAES, B. S. et al. 2007. Effects of four rice herbicides on some metabolic and toxicology parameters of teleost fish (*Leporinus obtusidens*). *Chemosphere*, v. 68, n. 8, p. 1597-1601.
- OAKES, K. D.; VAN DER KRAAK, G. J. 2003. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquatic Toxicology*, v. 63, p. 447-463.
- OLIVEIRA, M. C.; SCHOFFEN, J. P. F. 2010. Oxidative stress action in cellular aging. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 53, n. 6, p. 1333-1342.
- PERKINS, E. J.; SCHLENK, D. 2000. *In vivo* metabolism, acetylcholinesterase inhibition, and toxicokinetics of aldicarb in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Toxicological Sciences*, v. 53, p. 308-315.
- SHEEHAN, D. et al. 2001. Structure function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical Journal*, v. 360, p. 1-16.
- SANCHÉZ GARAYZAR, A. B. et al. 2016. Hepatic gene expression profiling in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to the fungicide chlorothalonil. *Comparative Biochemistry and Physiology, part D*, p. 1-10.
- SANTANA, L. M. B. M.; CAVALCANTE, R. M. 2016. Transformações metabólicas de agrotóxicos em peixes: Uma revisão. *Orbital: The Electronic Journal of Chemistry*, v. 8, n. 4, p. 257-268.
- SILVA, A. A.; GONÇALVES, R. C. 2010. Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais. *Ciência Rural*, v. 40, n. 4, p. 994-1002.
- SOREQ, H.; SEIDMAN, S. 2001. Acetylcholinesterase – new roles for an old actor. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 2, p. 294-302.

- TEODORAK, B. P. et al. 2015. Acute administration of fenproporex increased acetylcholinesterase activity in brain of young rats. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 87, n. 8, p. 1389-1395.
- TÔUGU, V. P.; KESVATERA, T. 1996. Role of ionic interactions in cholinesterase catalysis. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1298, p. 12-30.
- USEPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Chlorothalonil, 1999. Disponível em:  
<<https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/pdf/0097red.pdf>>. Acesso em: 10 de agosto, 2018.
- VAN DOORN, C.; VINK, M.; VAN DER POLL, J.M. 1995. Gas Chromatographic determination of chlorothalonil and its metabolite 4-hydroxy-2,5,6-trichloroisophthalonitrile (HTI) in water. *Chromatographia*, v. 40, p. 458-462.
- VAN SCOY, A. R.; TJEERDEMA, R. S. 2014. Environmental fate and toxicology of chlorothalonil. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 232, p. 89-105.
- VENTURA, E. C. 2004. Biomarcadores bioquímicos em *Orthopristis ruber* (Cuvier, 1830) (Perciformes – Haemulidae) e *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823) (Perciformes – Sciaenidae) coletados na costa sudeste brasileira. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. p. 115.
- WHITEHEAD, A. et al. 2017. When evolution is the solution to pollution: Key principles, and lessons from rapid repeated adaptation of killifish (*Fundulus heteroclitus*) populations. *Evolutionary Application*, v. 10, n. 8, p. 762-783.
- ZHANG, Q. et al. 2016. The identification of the metabolites of chlorothalonil in zebrafish (*Danio rerio*) and their embryo toxicity and endocrine effects at environmentally relevant levels. *Environmental Pollution*, v. 218, p. 8-15.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Atividade da glutationa-S-transferase (GST) no peixe da espécie *Micropogonias furnieri* obtida nos diferentes grupos experimentais (controle – C; 0,35 µg/g de clorotalonil – C1 e 3,5 µg/g de clorotalonil – C2), em tecidos de fígado e brânquias. Os asteriscos indicam médias significativamente diferentes entre si ( $p < 0,05$ ), sendo que os resultados estão expressos na forma de média e erro padrão (n=5).

**Figura 2.** Lipoperoxidação (LPO) no peixe da espécie *Micropogonias furnieri* obtida nos diferentes grupos experimentais (controle – C; 0,35 µg/g de clorotalonil – C1 e 3,5 µg/g de clorotalonil – C2), em tecidos de fígado, brânquias e músculo. Os asteriscos indicam médias significativamente diferentes entre si ( $p < 0,05$ ), sendo que os resultados estão expressos na forma de média e erro padrão (n=5).

**Figura 3.** Atividade da acetilcolinesterase (AChE) no peixe da espécie *Micropogonias furnieri* obtida nos diferentes grupos experimentais (controle – C; 0,35 µg/g de clorotalonil – C1 e 3,5 µg/g de clorotalonil – C2), em tecidos de cérebro e músculo. Os asteriscos indicam médias significativamente diferentes entre si ( $p < 0,05$ ), sendo que os resultados estão expressos na forma de média e erro padrão (n=5).

## FIGURAS

Figura 1

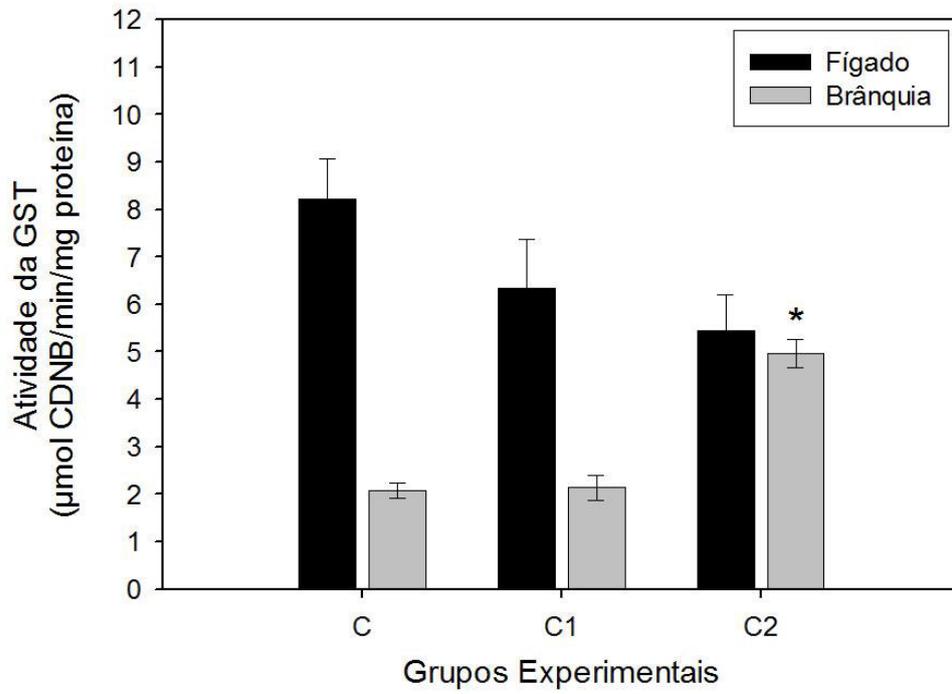


Figura 2

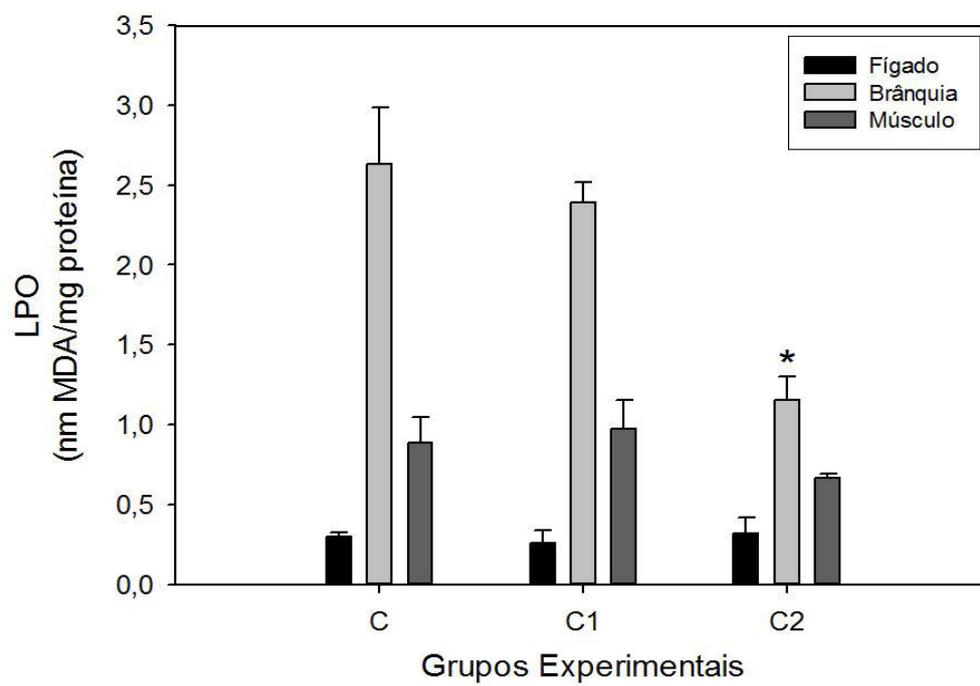
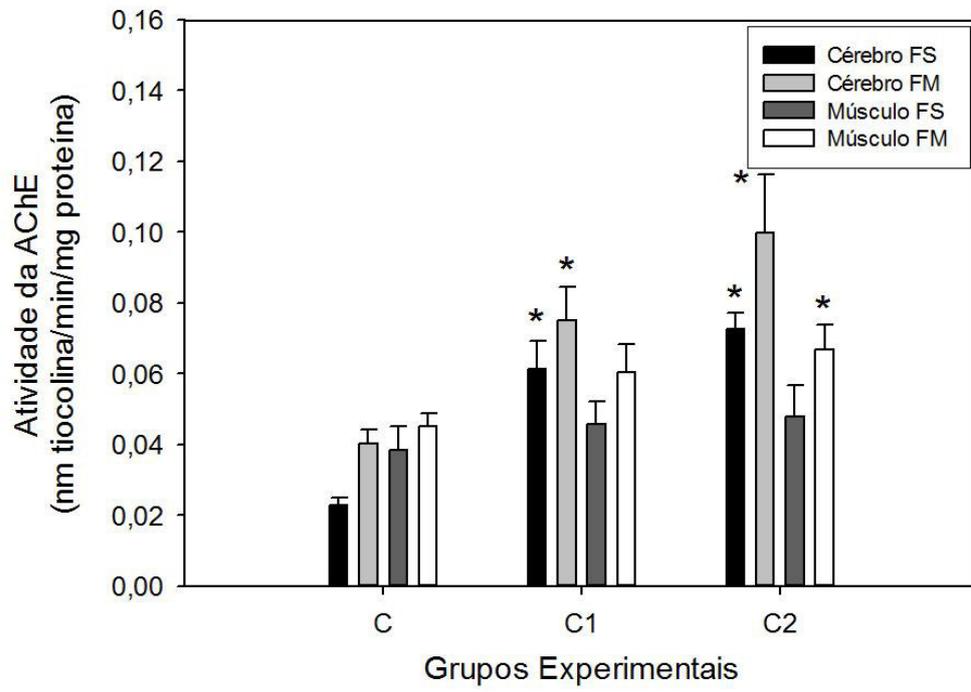


Figura 3



#### 4. CONCLUSÕES FINAIS

De acordo com os dados obtidos no presente estudo, conclui-se que:

- O clorotalonil induz a efeitos neurotóxicos (AChE), alterações no sistema de biotransformação de fase II (GST) e indução do sistema de defesas antioxidantes;
- A ativação da AChE diante da exposição ao clorotalonil pode ocorrer como um mecanismo de compensação ao aumento da hiperexcitação neural (devido a diminuição da atividade da AChE e consequente aumento dos níveis de ACh);
- A GST é importante na biotransformação do clorotalonil, mas possivelmente a espécie já está atuando em níveis elevados (observado pelos valores basais) devido a adaptações por conta das variações físico-químicas ambientais ou pelo contato com contaminantes;
- O fígado e o cérebro podem ser considerados os órgãos mais afetados pela exposição ao clorotalonil;
- Os biomarcadores mais eficientes de contaminação ao clorotalonil no *M. furnieri* foram as alterações da atividade da GST e da AChE, assim como os danos de DNA apresentados em outros estudos;
- A GSH pode representar um eficiente biomarcador para estas condições de ensaio.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTINI, V. O.; MACEDO, A. J.; MUXAGATA, E. 2018. O papel do biofilme bacteriano no acoplamento bentopelágico, durante o processo de bioincrustação. *Revista Liberato*, v. 19, p. 01-134.
- AMADO, L. L. et al. 2006. Biomarkers in croakers *Micropogonias furnieri* (Teleostei: Sciaenidae) from polluted and non-polluted areas from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil): evidences of genotoxic and immunological effects. *Marine Pollution Bulletin*, v. 52, p. 199-206.
- AMARA, I. et al. 2018. Antifouling processes and toxicity effects of antifouling paints on marine environment. A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 57, p. 115-130.

- AMORIM, L. C. A. 2003. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 6, n. 2, p. 158-170.
- ANP. AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. Workshop sobre Desativação de Instalações Marítimas, 2016. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/wwwanp>>. Acesso em: 15 de agosto, 2018.
- ANTAQ. AGÊNCIA NACIONAL DE TRANSPORTES AQUAVIÁRIOS. Meio Ambiente e os Impactos Ambientais. Disponível em: <[http://antaq.gov.br/Portal/MeioAmbiente\\_Os\\_impactos\\_ambientais.asp](http://antaq.gov.br/Portal/MeioAmbiente_Os_impactos_ambientais.asp)>. Acesso em: 15 de agosto, 2018.
- ARVANITIS, A. C.; BOERTH, D. W. 2001. Modeling of the mechanism of nucleophilic aromatic substitution of fungicide chlorothalonil by glutathione. *Journal of Molecular Modeling*, v. 7, p. 245-256.
- BAO, V. W. W. et al. 2011. Acute toxicities of five commonly used antifouling booster biocides to selected subtropical and cosmopolitan marine. *Marine Pollution Bulletin*, v. 62, p. 1147-1151.
- BAPTISTA NETO, A.; WALLNER-KERSANACK, M.; PATCHINEELAM, S. M. 2008. Poluição marinha. Rio de Janeiro: Interciência. p. 440.
- BASTOS, R. F.; FEITOSA, F. A. N.; MUNIZ, K. 2005. Variabilidade espaço-temporal da biomassa fitoplanctônica e hidrologia no estuário do rio Uma (Pernambuco-Brasil). *Tropical Oceanography*, Recife, v. 33, n. 1, p. 1-18.
- CALLICOTT, K.; HOOPER-BÙI, L. 2019. An investigation of environmental concentrations of antrazine, chlorothalonil, and fipronil in a Mississippi River-influenced marsh in Southern Louisiana. *Microchemical Journal*, v. 146, p. 1241-1248.
- CALLISTO, M.; GONÇALVES JR, J. F.; MORENO, P. 2004. Invertebrados aquáticos como bioindicadores. In: *Navegando o rio das velhas Minas aos Gerais*. Universidade Federal de Minas Gerais. p. 1-12.
- CAMERON, W. N. & PRITCHARD, D. W. 1963. Estuaries. In: Goldberg, E. D.; McCave, I. N.; O'Brien, J. J. & Steele, J. H. eds. *The Sea*. New York, John Wiley & Sons. p. 306-324.
- CASTELLO, J. P. et al. 2015. *Introdução às ciências do mar*. Pelotas: Ed. Textos. p. 602.

- CASTRO, I. B.; WESTPHAL, E.; FILLMANN, G. 2011. Tintas anti-incrustantes de terceira geração: novos biocidas no ambiente aquático. *Química Nova*, v. 34, n. 6, p. 1021-1031.
- CASTRO, M. S. 2017. Genotoxicidade e mutagenicidade do biocida anti-incrustante clorotalonil na espécie *Micropogonias furnieri*, Desmarest, 1823. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade e Conservação). Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Conservação. p. 47.
- CLARK, J. 1996. *Coastal Zone Management Handbook*. New York: Lewis Publisher/CRC Press. p. 694.
- COSTA, C. R.; OLIVI, P. 2008. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Química Nova*, v. 31, n. 7, p. 1820-1830.
- DA GAMA, B. A. P.; PEREIRA, R. C.; COUTINHO, R. 2009. Bioincrustação marinha. In: Pereira, RC. & Soares-Gomes, A. (orgs.) *Biologia Marinha*. 2ª edição, editora Interciência, Rio de Janeiro. p. 299-318.
- DANZE, A. P.; VERCELLINO, I. S. 2018. Uso de bioindicadores no monitoramento da qualidade da água. *Revinter*, v. 11, n. 01, p. 100-115.
- DAVIES, P. E. 1984. Chlorothalonil, its environmental fate, toxicology and metabolism fish. PHD thesis of the requirements for degree of doctor of philosophy, University of Tasmania, Hobart. p. 316.
- DAVIES, P. E.; WHITE, R. W. G. 1985. The toxicology and metabolism of chlorothalonil in fish. I. Lethal levels for *Salmo gairdneri*, *Galaxias maculatus*, *G. truttaceus* and *G. auratus* and the fate of 14C-TCIN in *S. gairdneri*. *Aquatic Toxicology*, v. 7, p. 93-105.
- DAVIES, P. E. 1985. The toxicology and metabolism of chlorothalonil in fish. II. Glutathione conjugates and protein binding. *Aquatic Toxicology*, v. 7, p. 265-275.
- DAVIES, P. E. 1987. Physiological, anatomic and behavioural changes in the respiratory system of *Salmo gairdneri* rich. On acute and chronic exposure to chlorothalonil. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 88, part C, n. 1, p. 113-119.
- DISCOVER LIFE. *Micropogonias furnieri*. Disponível em: <<http://discoverlife.org/mp/search=Micropogonias+furnieri>>. Acesso em: 05 de agosto, 2018.
- DOS SANTOS, L. M. F. 2004. Atividade de etoxiresorufina-O-deetilase, frequência de micronúcleos, níveis de metais, índice hepático e fator de condição em peixes

provenientes da bacia do Rio Paraíba do Sul. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública). Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública. p. 167.

ERNST, W. et al. 1991. The toxicity of chlorothalonil to aquatic fauna and the impact of its operational use on a pond ecosystem. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 21, p. 1-9.

FIGUEIREDO, J. A. et al. 2007. Evolução físico-química de águas do estuário do rio Timbó: um caso de reavaliação ambiental (1984-2003). *Estudos Geológicos*, v. 17, n. 1, p. 85-104.

GALLAGHER, E. P. et al. 1991. Glutathione-S-transferase-mediated chlorothalonil metabolism in liver and gill subcellular fractions of channel catfish. *Biochemical Pharmacology*, v. 42, n. 1, p. 139-145.

GALLAGHER, E. P. et al. 1992. The protective role of glutathione in chlorothalonil-induced toxicity to channel catfish. *Aquatic Toxicology*, v. 23, p. 155-168.

GLINSKI, D. A. et al. 2018. Analysis of pesticides in surface water, stemflow, and throughfall in an agricultural area in South Georgia, USA. *Chemosphere*, v. 209, p. 496-507.

ISAAC, V. J. 1988. Synopsis of biological data on the whitemouth croaker, *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823). FAO fish synopsis. p. 150.

KLIMA NATURALI. *Micropogonias furnieri*. Disponível em:

< [Http://www.klimanaturali.org/2011/05/corvina-micropogonias-furnieri.html](http://www.klimanaturali.org/2011/05/corvina-micropogonias-furnieri.html)>. Acesso em: 05 de agosto, 2018.

MAGALHÃES, D. DE P.; FILHO, A. DA S. F. 2008. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecologia Brasiliensis*, v. 12, n. 3, p. 355-381.

MARINE LINK. Controles de incrustação em barcos de trabalho. Disponível em: <<http://pt.marinelink.com/news/control-incrustação-barcos-trabalho-264307>>. Acesso em: 15 de fevereiro, 2019.

MARTINS, T. L. & VARGAS, V. M. F. 2013. Riscos a biota aquática pelo uso de tintas anti-incrustantes no casco de embarcações. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*, v. 8, n. 1, p. 01-11.

- MMA. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Resolução CONAMA 357, 2005. Disponível em: <<http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>>. Acesso em: 15 de agosto, 2018.
- PIMENTA, S. M. et al. 2016. Estudo da qualidade da água por meio de bioindicadores bentônicos em córregos da área rural e urbana. *Ambiente & água*, v. 11, n. 1, p. 198-2010.
- PRITCHARD, D. W. 1967. What is an estuary: a physical viewpoint. *American Association for the Advancement of Science*, v. 83, p. 3–5.
- SANCHÉZ GARAYZAR, A. B. et al. 2016. Hepatic gene expression profiling in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to the fungicide chlorothalonil. *Comparative Biochemistry and Physiology, part D*, p. 1-10.
- SONAK, S. et al. 2009. Implications of the ban on organotins for protection of global coastal and marine ecology. *Journal Environmental Management*, v. 90, p. S96-S108.
- SOROLDONI, S. et al. 2017. Are antifouling paint particles a continuous source of toxic chemicals to the marine environment? *Journal of Hazardous Materials*, v. 330, p. 76-82.
- TILLMAN, R. W.; SIEGEL, M. R.; LONG, J. W. 1973. Mechanism of action and fate of the fungicide chlorothalonil (2,4,5,6-Tetrachloroisophthalonitrile) in biological systems. I. Reactions with cells and subcellular components of *Saccharomyces pastorianus*. *Pesticide, Biochemistry and Physiology*, v. 3, p. 160-167.
- THOMAS, K. V.; BROOKS, S. 2010. The environmental fate and effects of antifouling paint biocides. *Biofouling*, v. 26, n. 1, p. 73-88.
- TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D. 2003. The role of glutathione S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene*, v. 22, p. 7369 – 7375.
- TURNER, A. 2010. Marine Pollution from antifouling paint particles. *Marine Pollution Bulletin*, v. 60, p. 159 – 171.
- USEPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Chlorothalonil, 1999. Disponível em:  
<<https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/pdf/0097red.pdf>>. Acesso em: 10 de agosto, 2018.
- VAN DOORN, C.; VINK, M.; VAN DER POLL, J.M. 1995. Gas Chromatographic determination of chlorothalonil and its metabolite 4-hydroxy-2,5,6-trichloroisophthalonitrile (HTI) in water. *Chromatographia*, v. 40, p. 458–462.

- VAN SCOY, A. R.; TJEERDEMA, R. S. 2014. Environmental fate and toxicology of chlorothalonil. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 232, p. 89-105.
- VENTURA, E. C. 2004. Biomarcadores bioquímicos em *Orthopristis ruber* (Cuvier, 1830) (Perciformes – Haemulidae) e *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823) (Perciformes – Sciaenidae) coletados na costa sudeste brasileira. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. p. 115.
- ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. 2006. *Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações*. São Carlos: Rima. p. 478.

## ANEXOS

### NORMAS PARA SUBMISSÃO DE ARTIGOS: REVISTA “Marine Pollution Bulletin”

Tabela 1. Informações sobre a revista.

ISSN	Nome	Área de Avaliação	Qualis	Volumes por ano
0025-326X	Marine Pollution Bulletin (Online)	Geociências	A2	2

### REGRAS PARA PREPARAÇÃO DE NOVA SUBMISSÃO

A submissão a este periódico segue totalmente online. Pode ser um arquivo PDF ou um documento do Word, em qualquer formato ou layout que possa ser usado pelos avaliadores para avaliação. As figuras devem estar em alta qualidade. Podem ser enviados todos ou alguns arquivos de origem para a submissão inicial. Figuras individuais com mais de 10 MB devem ser enviadas separadamente.

### REFERÊNCIAS

As referências podem estar em qualquer estilo ou formato, desde que o estilo seja consistente. Onde for aplicável, o nome (s) do (s) autor (es), título da revista / título do livro, título do capítulo / título do artigo, ano de publicação, número do volume / capítulo do livro e o número do artigo ou paginação, deve estar presente. O uso do DOI é altamente incentivado. O estilo de referência usada pela revista será aplicado ao artigo aceito pela Elsevier na etapa de revisão. Os dados faltantes serão destacados na fase de revisão para o autor corrigir.

### REQUISITOS PARA FORMATAÇÃO

Não há requisitos rigorosos de formatação, mas todos os manuscritos devem conter os elementos essenciais necessário para transmitir o seu manuscrito, por exemplo: Resumo, Palavras-chave, Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Conclusões, Figuras e Tabelas com Legendas. Se o artigo incluir vídeos e/ou outro material suplementar, isso deve ser incluído na submissão inicial para fins de revisão por pares. O artigo deve ser dividido claramente em seções definidas.

## **RESUMO**

O resumo não deve exceder 150 palavras.

## **PALAVRAS-CHAVE**

Imediatamente após o resumo, devem ser fornecidas no máximo 6 palavras-chave, usando ortografia americana e evitando termos gerais, plurais e conceitos múltiplos (evite, por exemplo, "e", "de"). Onde for relevante, estas devem incluir as principais espécies em causa, a área geográfica e o contaminante. Apenas abreviações estabelecidas firmemente na área podem ser elegíveis. Estas palavras-chave serão usadas para fins de indexação. Observe que as instruções relacionadas ao resumo e ao resumo gráfico ainda se aplicam às novas submissões.