

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CONSERVAÇÃO E MANEJO DE  
RECURSOS NATURAIS – NÍVEL MESTRADO

CAMILA MARIA TOIGO DE OLIVEIRA PIFFERO

METABOLISMO ENERGÉTICO, SISTEMA ANTIOXIDANTE E ATIVIDADE DE  
COLINESTERASES DE OVOS E LARVAS DE *RHAMDIS QUELEN*:  
DESENVOLVIMENTO EM AGUAS DE RIOS COM DIFERENÇAS DE USO E  
OCUPAÇÃO DE SOLO

CASCAVEL-PR  
FEVEREIRO/2020

CAMILA MARIA TOIGO DE OLIVEIRA PIFFERO

METABOLISMO ENERGÉTICO, SISTEMA ANTIOXIDANTE E ATIVIDADE DE  
COLINESTERASES DE OVOS E LARVAS DE *RHAMDIS QUELEN*:  
DESENVOLVIMENTO EM AGUAS DE RIOS COM DIFERENÇAS DE USO E  
OCUPAÇÃO DE SOLO

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais – Nível Mestrado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Conservação e Manejo de Recursos Naturais

Área de Concentração: Ciências Ambientais

Orientador: Ana Tereza Bittencourt  
Guimarães

CASCAVEL-PR  
FEVEREIRO / 2020

## FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Piffero, Camila Maria Toigo de Oliveira  
METABOLISMO ENERGÉTICO, SISTEMA ANTIOXIDANTE E ATIVIDADE  
DE COLINESTERASES DE OVOS E LARVAS DE RHAMDIRA QUELEN:  
DESENVOLVIMENTO EM ÁGUAS DE RIOS COM DIFERENÇAS DE USO E  
OCUPAÇÃO DE SOLO / Camila Maria Toigo de Oliveira  
Piffero; orientador(a), Ana Tereza Bittencourt Guimarães,  
2020.  
63 f.

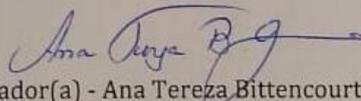
Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste  
do Paraná, Campus de Cascavel, Centro de Ciências  
Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-Graduação em  
Conservação e Manejo de Recursos Naturais, 2020.

1. Uso e Ocupação do Solo. 2. Contaminação de águas de  
rios . 3. Pesticidas . 4. Sistemas de defesas celulares.  
I. Guimarães, Ana Tereza Bittencourt . II. Título.

**CAMILA MARIA TOIGO DE OLIVEIRA**

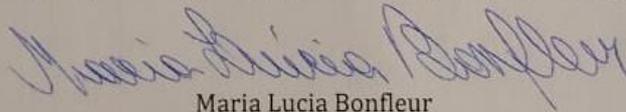
**Metabolismo energético, sistema antioxidante e atividade de colinesterases de ovos e larvas de *Rhamdia quelen*: desenvolvimento em águas de rios com diferenças de uso e ocupação de solo**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestra em Conservação e Manejo de Recursos Naturais, área de concentração Ciências Ambientais, linha de pesquisa Biologia Comparada e Indicadores de Qualidade No Ambiente Aquático, APROVADO(A) pela seguinte banca examinadora:



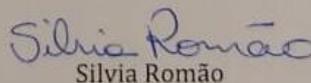
Orientador(a) - Ana Tereza Bittencourt Guimarães

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)



Maria Lucia Bonfleur

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)



Sílvia Romão

Universidade Federal da Fronteira Sul - Campus de Laranjeiras do Sul (UFFS)

Cascavel, 28 de fevereiro de 2020

UNIOESTE

Existe uma pessoa em minha vida doce, maravilhosa e incrivelmente amável. Ela em todos os momentos me fortaleceu para que eu pudesse chegar até aqui. Por isso, cada palavra e esforço dedicado a este trabalho dedico a melhor professora de todos os tempos Ana Tereza.

## AGRADECIMENTOS

Todo o tempo e esforço dedicado a este trabalho traduz a gana por se dedicar a ciência. É o desejo de descobrir aquelas verdades que por mais que esperadas ainda não são comprovadas.

Não somos pessoas orgulhosas, mas estamos incrivelmente satisfeitas por avançar em estudar uma área até então não dominada por nós.

Por chegar até aqui agradeço a Deus pela vida.

Agradeço minha professora e orientadora por me aturar e por acreditar que eu poderia me superar a cada dia, a ela também dedico cada R<sup>2</sup> de minhas insanas pipetagens das quais tenho saudade.

Não tenho muitos amigos, mas aos que tenho com certeza agradecerei pessoalmente pelos tempos divertidos que passamos.

Agradeço meu esposo, por me ajudar a concluir esta etapa importante na minha vida intelectual e por estar comigo mesmo sem poder estar junto.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL .....	8
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	9
2.1 EVOLUÇÃO DO USO E OCUPAÇÃO DO SOLO NO BRASIL .....	9
2.2 USO DE AGROTÓXICOS .....	11
2.2.1 Inseticidas .....	11
2.2.2 Fungicidas .....	12
2.2.3 Herbicidas .....	12
2.3 EFEITOS DO USO DE AGROTÓXICOS SOBRE A SAÚDE DE PEIXES .....	13
2.3.1 Metabolismo Energético .....	16
2.3.2 Sistema Antioxidante .....	19
2.4 DANOS DECORRENTES DA ALTERAÇÃO DO METABOLISMO ENERGÉTICO E SISTEMA ANTIOXIDANTE .....	231
2.4.1 Estresse oxidativo mensurado por lipoperoxidação .....	231
2.4.2 Inativação das enzimas colinesterases .....	242
2.5 OBJETO EM ESTUDO .....	253
2.5.1 Efeito do Uso de Agrotóxicos Sobre o Desenvolvimento Embrionário de Peixes .....	275
REFERÊNCIAS .....	27
<b>Capítulo 1.</b> Alterações metabólicas do desenvolvimento embrionário de <i>Rhamdia quelen</i> em exposição a águas de riachos com diferenças de uso e ocupação de solo .....	35

## RESUMO

A diversidade no uso e ocupação do solo também resulta em diferentes efeitos interligados nos ambientes, muitos deles negativos. Como exemplo, temos o uso contínuo de terras para a agricultura em que a utilização massiva de agrotóxicos dispensa grandes quantidades de compostos químicos na água por meio da lixiviação. A presença destes compostos na água causa reações adversas nos organismos. Esses efeitos podem ser dimensionados por meio da quantificação enzimática de enzimas do metabolismo energético e sistema antioxidante, mensuração da reação de lipoperoxidação e atividade de colinesterases. Para tanto, espécies nativas e com potencial econômico são de boa aceitação para tais estudos. Em nosso caso, a espécie nativa *Rhamdia quelen* foi utilizada para os testes de biomarcadores ambientais. As águas de riachos da região oeste do Paraná foram utilizadas, sendo coletadas amostras de águas de um riacho considerado impactado (Rio Tormenta) e outro considerado preservado por estar localizado dentro do Parque Nacional do Iguaçu (Rio Manoel Gomes). Ovócitos de *R. quelen* foram fertilizados nestas águas e acompanhados por 12h, 24h, 48h e 72h de desenvolvimento. Nestes tempos de experimentação, um *pool* de organismos foi amostrado, devidamente acondicionados para posterior análises do metabolismo energético, sistema antioxidante, estresse oxidativo e atividade da enzima colinesterase. Os animais desenvolvidos em água do rio referência apresentaram indução do metabolismo aeróbico nas primeiras 24 horas de desenvolvimento e drástica redução entre 48 e 72h horas. No mesmo período observou-se produção de lipoperóxido e modulação do sistema de defesa antioxidante. Foram encontradas alterações das atividades enzimáticas do metabolismo energético (HK, PFK, LDH, CS, MDH) e do sistema de defesa antioxidante (CAT, GPX, GR, GST) nos animais desenvolvidos com água do rio considerado impactado em relação do rio referência. Além disso, características de contaminação por composto anticolinesterásicos como organofosforados e carbamatos, como a inibição de enzimas colinesterases. Os efeitos causados por agrotóxicos presentes em concentrações-traço em águas de riachos podem ser diversos. Locais com utilização constante desses compostos podem desencadear efeitos deletérios de organismos em estágios iniciais de

desenvolvimento e alteram atividades enzimáticas metabólicas e de defesa do organismo.

**Palavras-chave:** uso e ocupação do solo, pesticidas, sistema antioxidante, metabolismo energético, lipoperoxidação

ENERGETIC METABOLISM, ANTIOXIDANT SYSTEM AND RHYDIA QUELEN EGG AND LARVA CHOLINESTERASE ACTIVITY: DEVELOPMENT IN RIVER WATERS WITH DIFFERENCES IN USE AND SOIL OCCUPATION

### ABSTRACT

The diversity in land use and occupation also results in different interconnected effects on the environments, many of them negative. As an example, we have the continuous use of land for agriculture in which the massive use of pesticides dispenses large quantities of chemical compounds in water through leaching. The presence of these compounds in the water causes adverse reactions in the organisms. These effects can be measured by enzymatic quantification of enzymes in the energy metabolism and antioxidant system, measurement of the lipoperoxidation reaction and cholinesterase activity. Therefore, native species with economic potential are well accepted for such studies. In our case, a native species *Rhamdia quelen* was used for the testing of environmental biomarkers. The waters of streams in the western region of Paraná were used, being collected from the waters of a stream considered impacted (Rio Tormenta) and another stream considered preserved because it is located within the Iguaçu National Park (Rio Manoel Gomes). *R. quelen* oocytes were fertilized with water and followed for 12h, 24h, 48h and 72h in development. In these times of experimentation, a pool of organisms was sampled, properly packed for further analysis of energy metabolism, antioxidant system, oxidative stress and cholinesterase enzyme activity. Animals developed in river water reference the induction of aerobic metabolism in the first 24 hours of development and a drastic reduction between 48 and 72 hours. In the same period, lipoperoxide production and modulation of the antioxidant defense system were observed. Changes in the enzymatic activities of energy metabolism (HK, PFK, LDH, CS, MDH) and of

the antioxidant defense system (CAT, GPX, GR, GST) were found in animals developed with water from the river considered impacted in relation to the reference river. In addition, the characteristics of contamination by anticholinesterase compounds such as organophosphates and carbamates, such as the inhibition of cholinesterase enzymes. The effects caused by pesticides present in trace gifts in stream waters can be diverse. Sites with constant compound use can trigger deleterious effects of organisms in early stages of development and alter metabolic enzyme activities and defense of the organism.

**KEYWORDS:** land use and occupation, pesticides, antioxidant system, energy metabolism, lipoperoxidation

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O sucesso na produtividade agrícola brasileira é acompanhado pelo uso exacerbado de agrotóxicos (REBELO *et al.*, 2010). A aplicação excessiva de compostos químicos no meio ambiente, tem por consequência as contaminações dos sistemas atmosféricos, aquáticos e terrestres (SINGH E WALKER, 2006).

Por meio do processo de lixiviação, constantemente ocorre a dispensação de xenobióticos (agentes estranhos ao organismo), como os agrotóxicos, em corpos d'água. Contaminações devido a presença de agrotóxicos no ambiente afetam o estado da saúde de indivíduos e, por conseguinte podem diminuir o *fitness* de uma população (BURIGO, 2016), promovendo o declínio populacional e afetando especialmente os estágios iniciais de desenvolvimento, culminando em maior risco de mortalidade em estágios posteriores (EDER *et al.*, 2006).

Locais de intenso uso e ocupação das terras pela agricultura tendem a ser áreas de potencial contaminação às espécies (MAURICE *et al.*, 2013). Como exemplo, pode-se citar a região oeste do Paraná, que possui extensas áreas reservadas para o cultivo agrícola. Áreas como essa são exemplos da necessidade de investigação dos efeitos deletérios causados em organismos não-alvo, tais como avaliação de danos celulares em ácidos nucleicos, fosfolipídios e proteínas em peixes expostos a águas contaminadas (GRINVENNIKOVA E VINOGRADOV, 2006; VALKO *et al.*, 2006). Os processos a serem investigados podem ser caracterizados pela quantificação das modulações nas atividades enzimáticas como também por meio da detecção dos danos fisiológicos (HALLIWEL E GUTTERIDGE, 2015).

A utilização de espécies de peixes nativos, com potencial econômico em ascensão, pode demonstrar os efeitos diretos dessas contaminações. Além disso, podem indicar a população humana o risco associado a integração desses peixes à dieta alimentar. Para tanto, *Rhamdia quelen* é um útil bioindicador, pois é uma espécie nativa epromissora no mercado consumidor (CARNEIRO, 2004; ZABONI-FILHO, 2004;).

Diante do exposto, o presente estudo tem por objetivo avaliar os efeitos metabólicos da exposição de embriões de *Rhamdia quelen* às águas de dois riachos com diferenças de uso e ocupação de solo.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 EVOLUÇÃO DO USO E OCUPAÇÃO DO SOLO NO BRASIL

A evolução do uso e ocupação do solo no Brasil se deu de forma gradativa. A partir da Lei das Terras de 1850, as mesmas passaram do uso comum a devolutas, podendo ser utilizada para interesses pessoais (BRASIL, 1850, p. 307).

A mudança da legislação transformou a situação da época, beneficiando principalmente os grandes latifundiários com a possibilidade de grande produção de café. Outros, ainda, compravam grandes propriedades e depois revendiam em lotes para pequenos agricultores. Isso facilitou a expansão da ocupação do território nacional (GASPAR, 2005).

Enquanto a exploração das terras no campo era feita de forma acentuada, as cidades cresciam, principalmente em torno de áreas com maior possibilidade de utilização de recursos hídricos, garantindo assim a expansão econômica (MMA, 2006). No entanto, a competição pelos recursos naturais (solo e água) aumentou, criando cada vez mais efeitos interligados entre a população humana e o ambiente natural (GASPAR, 2005). A caracterização do uso do solo pode ajudar nos esforços para detectar tais efeitos. No Brasil, é possível notar um cenário heterogêneo em relação as paisagens. A agropecuária por exemplo, ocupa 27% do território, enquanto 23% das terras são consideradas devolutas e 14% do total para conservação (fig. 1, IBGE, 2014).



Fatores extrínsecos contribuem para que a agricultura seja fortemente consolidada na região oeste do Paraná, como o solo, classificado como Latossolo Bruno Distrófico de textura argilosa; e o clima, que apresenta temperaturas moderadas, com chuvas bem distribuídas, verão com altas temperaturas e inverno praticamente sem geadas (ICHIBA, 2005; MELO *et al.*, 2007).

O sucesso na produtividade atual constantemente vem acompanhado pelo excesso do uso de agrotóxicos e extração da mata ciliar fora dos padrões legais. A soma desses fatores com o cultivo intenso pode resultar em excesso de lixiviação, promovendo o despejo de resíduos de produtos químicos na água, gerando alterações na sua qualidade e afetando organismos não-alvo (MMA, 2017). A Organização Mundial da Saúde (OMS, 1996) alerta sobre os efeitos deletérios dos grupos químicos dispensados nos solos.

## 2.2 USO DE AGROTÓXICOS

Agrotóxicos são considerados os produtos utilizados para produção agrícola, cuja função é evitar a ação danosa de seres vivos considerados nocivos, podendo ser utilizados como desfolhantes, desseccantes, estimuladores e inibidores de crescimento (BRASIL, 1989). Segundo a ANVISA (2011) são classificados como “ingredientes ativos com elevado grau de toxicidade aguda comprovada e que causam problemas neurológicos, reprodutivos, de desregulação hormonal e até câncer [...]”. Os agrotóxicos podem ser divididos em grupos funcionais, sendo eles: inseticidas, fungicidas e herbicidas (WHO, 1990).

### 2.2.1 Inseticidas

Dentre o grupo dos inseticidas estão os organofosforados, carbamatos, organoclorados e piretróides. Os organofosforados são compostos orgânicos derivados do ácido fosfórico, tiofosfórico ou ditofofórico. Enquanto carbamatos são derivados do ácido carbâmico e os organoclorados tem sua composição de carbono com radicais de cloro. Os piretróides são compostos sintéticos, com estrutura semelhante à piretrina, a qual é extraída da espécie vegetal *Chysanthemum cinerariaefolium* (OMS, 1996).

Há relatos na literatura que especificam os efeitos causados pelos inseticidas, como por exemplo, ações agudas (fraqueza, cólicas, vômitos, espasmos musculares, convulsões, etc.), ou crônicas (efeitos neurotóxicos retardados, alterações cromossomais, lesões hepáticas, lesões renais, hipersensibilidade etc.) (OMS, 1996).

Em abelhas (*Apis mellífera*), o inseticida organofosforados conhecido como dimetoato causa inibição das acetilcolinesterases, levando diminuição do hábito de forrageio da espécie devido a polinização (CHRISTEN *et al.*, 2019).

### 2.2.2 Fungicidas

Os ditiocarbamatos são exemplos do grupo dos fungicidas. São derivados do ácido ditiocarbâmico ( $\text{NH}_2\text{CS}_2\text{H}$ ), com estruturas semelhantes aos carbamatos ( $\text{CH}_3\text{NO}_2$ ) (PERZ *et al.*, 2000).

Os fungicidas estão associados a causarem tonturas, vômitos, tremores musculares, dor de cabeça, teratogêneses, irritações na mucosa, doença de Parkinson etc. (OMS, 1996).

O mancozeb, é um fungicida utilizado na agricultura, e a exposição deste composto ao fungo *Saccharomyces cerevisiae*, eleva a quantidade de EROs da mitocôndria, causando, em alguns casos, a apoptose (SCARIOT, 2016).

### 2.2.3 Herbicidas

Os herbicidas apresentam grupos químicos conhecidos como dinitroferóis, pentaclorofenol, fenoxiacéticos e dipiridilos, sendo causadores de cânceres, indutores de produção de enzimas hepáticas, lesões hepáticas, além fibrose pulmonar, entre outros (OMS, 1996).

O herbicida da classe das glicinas, o glifosato, apresentou alterações no estado de saúde de *Raba catesbeiana*, quando expostos a concentrações inferiores a 240  $\mu\text{g/L}$ . Esse composto induz a modulação de enzimas do estresse oxidativo em diferentes tecidos do corpo do animal, assim como aumenta ácido úrico e corticosterona, entre outros efeitos (WILKENS *et al.*, 2019).

## 2.3 EFEITOS DO USO DE AGROTÓXICOS SOBRE A SAÚDE DE PEIXES

Existem amplas evidências do conjunto de efeitos que estes resíduos químicos podem promover em peixes.

Benaee *et al.* (2014) testaram a capacidade antioxidante de *Alburnus mossulensis* diante da exposição ao inseticida piretróide fenopatrina, sendo que os resultados demonstraram que tal inseticida desregula parâmetros bioquímicos e induz o estresse oxidativo. Do Amaral (2017) testou a toxicidade de águas contaminadas por pesticidas em um reservatório no Rio Grande do Sul, e verificou que peixes da espécie *Loricariichthys anus*, coletados na bacia, apresentaram diminuição da aptidão, da capacidade reprodutiva ou forrageira e desvios de energia metabólica.

O cobre é utilizado para compor misturas para a formação de fungicidas (sulfato de cobre, oxiclreto de cobre, hidróxido de cobre), e de herbicidas (sulfato de cobre Pentaidratado) (CARARRO, 1997). Carvalho e Fernandes (2007) testaram o efeito do cobre no *Prochilodus lineatus* e detectaram a redução da disponibilidade de energia por meio do descontrole do metabolismo da glicose, aumentando os efeitos tóxicos do cobre.

Diante destes breves relatos sobre efeitos da exposição à agrotóxicos sobre a saúde de peixes, torna-se necessária a descrição de alguns biomarcadores amplamente estudados, como as enzimas pertencentes ao metabolismo energético e ao sistema antioxidante, bem como o estresse oxidativo, e, por fim, a atividade da enzima colinesterase do sistema colinérgico.

### 2.3.1 Metabolismo Energético

O metabolismo energético (ME) é um sistema altamente especializado, contando com ajustes finos regulados por hormônios como insulina, glucagon, adrenalina e cortisol. Para que tais ajustes funcionem, enzimas são induzidas, ou inibidas, para oxidar ou reduzir moléculas, criando um circuito de metabolização da glicose (NELSON E COX, 2017).

A metabolização da glicose se inicia por um conjunto de reações químicas chamado de glicólise, cujas reações ocorrem no citoplasma das células. Durante esse processo, parte da energia liberada durante as reações é armazenada na forma de adenosina trifosfato (ATP) e nicotinamida adenina dinucleotídeo

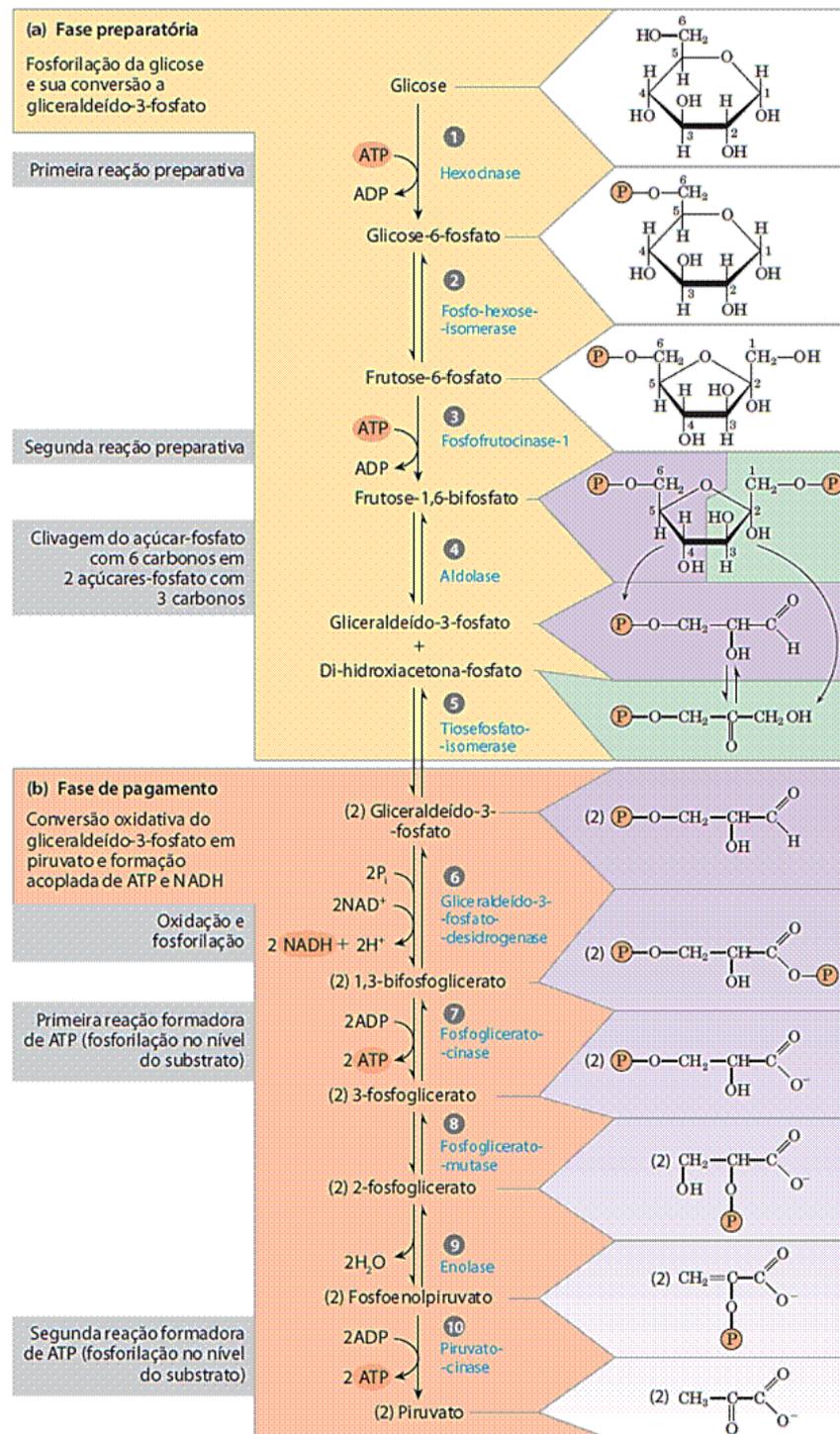
(NADH), sendo que esses dois compostos servem como carreadores de energia. Ao final das reações ocorre a formação de duas moléculas de piruvato (Fig. 3, NELSON e COX, 2017).

A glicólise é subdividida em duas etapas: fase preparatória e fase de pagamento. Na fase preparatória, a hexocinase (HK) é a primeira enzima em atuação, sendo que sua função é catalisar a conversão de uma glicose a glicose-6-fosfato, por meio da hidrólise de ATP (KUETTNER *et al.*, 2010). A glicose-6-fosfato pode continuar em reações desta etapa da glicólise, mas também pode ser direcionada a uma rota alternativa conhecida como via das pentoses fosfato. Em inúmeros tecidos, como medula óssea, a pele e a mucosa intestinal, esta via de reações utiliza o NADP<sup>+</sup> comoceptor de elétrons e pode, ao final do processo gerar ácido ribonucleico (RNA), ácido desoxirribonucleico (DNA) e coenzimas (ATP, NADH, flavina adenina dinucleotídeo - FADH<sub>2</sub> - e coenzima A). Em alguns outros tecidos, como os eritrócitos e as células da córnea e do cristalino, que estão constantemente expostos ao oxigênio, o produto essencial das vias das pentoses-fosfato não é a pentose, mas sim o NADPH, cuja função pode ser contrapor os efeitos deletérios de radicais livres, mantendo a condição de ambiente redutor (NELSON e COX, 2017).

Após a ativação da glicose por meio da HK na fase preparatória, a glicose-6-fosfato é convertida em frutose-6-fosfato a partir da ação da enzima fosfoexose isomerase. A formação de frutose-1,6-bifosfato a partir da fosforilação da frutose-6-fosfato se dá pela enzima fosfofrutoquinase (PFK), sendo posteriormente lisada pela ação da enzima aldolase, em duas moléculas com três carbonos: a diidroxiacetona-fosfato e o gliceraldeído-3-fosfato. A diidroxiacetona-fosfato é isomerizada a gliceraldeído-3-fosfato por meio da ação da triose-fosfato-isomerase (NELSON e COX, 2017).

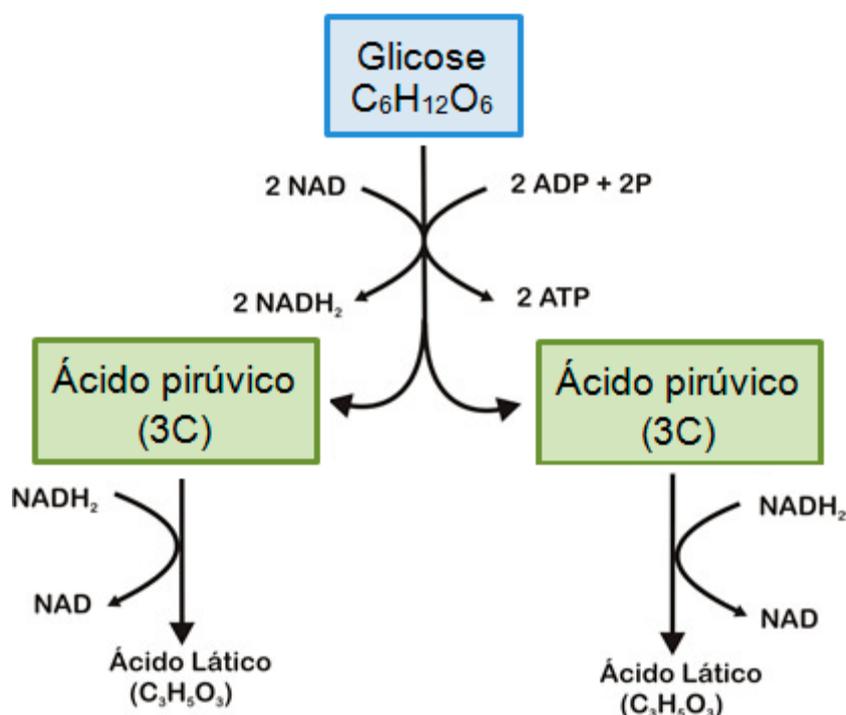
Na fase de pagamento da glicólise, cada molécula de gliceraldeído-3-fosfato é oxidada e fosforilada por um fosfato inorgânico a partir da ação da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, para então formar 1,3-bifosfoglicerato. Ocorre a transferência do fosfato do 1,3-bifosfoglicerato para uma molécula de adenosina di-fosfato (ADP) por meio da ação da enzima fosfoglicerato-quinase, formando ATP e 3-fosfoglicerato. Posteriormente, ocorre a conversão do 3-fosfoglicerato em 2-fosfoglicerato, sendo tal reação catalisada pela enzima fosfoglicerato-mutase. Ocorre, então, a desidratação do 2-

fosfoglicerato, processo que é catalisado pela enzima enolase, para formar fosfoenolpiruvato, sucedendo, por fim, a transferência do grupo fosfato do fosfoenolpiruvato para o ADP, gerando outro ATP. Esse processo é catalisado pela piruvato-quinase e tem como produto uma molécula de piruvato (ALBERTS, 2017). Após sintetizada, a molécula de piruvato pode seguir por rotas diferentes de metabolização (Fig. 3).



**Figura 3.** Etapas incluindo a fase preparatória e de pagamento da glicólise, incluindo reações e enzimas responsáveis. (NELSON e COX, 2015).

Uma das rotas possíveis para a condução do piruvato é sua redução a lactato, por meio da fermentação láctica (Fig. 4). Neste caso, a enzima lactato desidrogenase (LDH) é a representante da etapa final do metabolismo anaeróbico, ou seja, essas reações ocorrem em condições com baixa concentração de oxigênio, sendo que o piruvato recebe elétrons de uma molécula de  $\text{NADH}_2$ . Os principais locais que ocorrem a fermentação láctica são os músculos e os eritrócitos (NELSON e COX, 2017). A ativação demasiada de LDH pode caracterizar situações ambientais estressoras devido à baixa disponibilidade de oxigênio (ZAKHARTSEV *et al.*, 2014).



**Figura 4.** Rota alternativa da glicose para geração de energia, fase anaeróbica. (Fonte: <https://blogdoenem.com.br/biologia-enem-fermentacao-alcoolica-lactica/>)

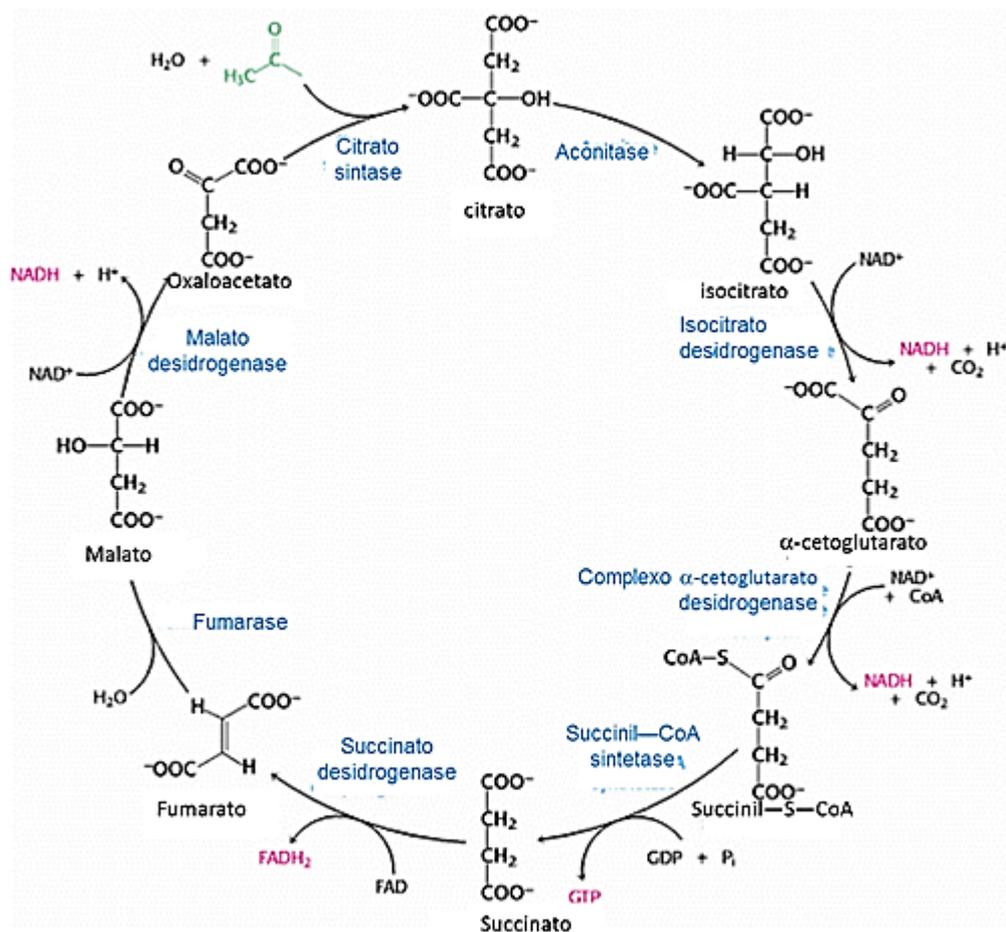
Outra possível rota a ser seguida pelo piruvato inicia-se com a perda do grupo carboxil na forma de  $\text{CO}_2$  para gerar o grupo acetil da acetil-coenzima A (acetil-CoA). Esse acetil é transportado até as cristas mitocondriais, onde será

condensado com o oxaloacetato, a partir da ação da enzima citrato sintase (CS), e então metabolizado no Ciclo do Ácido Cítrico (Fig. 5), também chamado de Ciclo de Krebs (NELSON e COX, 2017). A enzima CS é regulada pela energia disponível, pois quando o ATP se encontra em grandes quantidades e o sistema está altamente suprido, a enzima é inibida (SHEPHERD; GARLAND, 1969).

A função da enzima CS é realizar a junção das duas moléculas: AcetilCoA e oxaloacetato para formar citrato (CAMPBELL e FERRELL, 2017). Assim que esse composto é gerado ele é mobilizado até a segunda reação onde a enzima aconitase converte citrato em isocitrato. Posteriormente, o isocitrato é descarboxilado transformando-se em  $\alpha$ -cetogluturato por ação da enzima isocitrato desidrogenase, com auxílio de uma molécula de  $\text{CO}_2$ . Ocorre também a redução de NAD a NADH, além da liberação de um átomo de hidrogênio (VOET e VOET, 2013). O complexo  $\alpha$ -cetogluturato desidrogenase dá continuidade a série de reações, onde novamente ocorre uma descarboxilação, ou seja, o  $\alpha$ -cetogluturato será transformado em succinil-CoA, nesta etapa também ocorre a formação de NADH através da redução de NAD. Na quinta etapa do ciclo do ácido cítrico ocorre a formação de succinato. Neste momento a succinil coenzima A é hidrolisada pela succinil-CoA sintetase, havendo a fosforilação de guanosina difosfato (GDP) para guanosina trifosfato (ATP) ou adenosina monofosfato (ADP) a adenosina trifosfato (ATP). Na etapa sequencial o succinato é oxidado pela succinato desidrogenase, formando fumarato, e o FAD é reduzido em FADH neste momento. A fumarase é responsável pela sétima etapa do ciclo do ácido cítrico, pois ela acrescenta uma molécula de água ao fumarato, que devido à hidratação, transforma-se em malato. A enzima malato desidrogenase é responsável pela última etapa do ciclo e é também por oxidar malato em oxaloacetato (CAMPBELL & FARREL, 2017b; NELSON E COX, 2017; VOET & VOET, 2013).

Durante a etapas do ciclo do ácido cítrico, a energia liberada das várias oxidações é armazenada pela redução de  $\text{NAD}^+$ , FAD e produção de ATP, ou trifosfato de guanosina (GTP).

Apesar de estarem presentes no mesmo sistema de reações do ácido cítrico, CS e MDH nem sempre demonstram atividades dependentes, pois a MDH está presente também no citosol como uma isoenzima, regenerando oxaloacetato em malato (NELSON e COX, 2017).



**Figura 5.** Ciclo do ácido cítrico incluindo reações químicas e enzimas envolvidas (NELSON e COX, 2015).

O ciclo de ácido cítrico e suas reações geram grandes quantidades de elétrons, de forma que abastecem a cadeia respiratória (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; NELSON e COX, 2017). A cadeia respiratória, ou fosforilação oxidativa, ocorre na membrana interna das mitocôndrias e é responsável pela produção da maior parte de ATP da célula devido as reações de óxido-redução.

### 2.3.2 Sistema Antioxidante

Radicais livres são formados durante as reações do ciclo do ácido cítrico, sendo alguns considerados como espécies reativas a oxigênio (EROs) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015; NELSON e COX, 2017), as quais podem ser neutralizadas por meio do sistema antioxidante.

As EROs são moléculas em um estado energeticamente mais reativo, ou seja, possuem uma maior capacidade de reagir com outras substâncias (BREUSEGEM *et al.*, 2001; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015), pode-se dizer ainda que as espécies reativas de oxigênio, são moléculas radicalares ou não radicalares em um estado energeticamente ativo. Estas moléculas são, principalmente formadas durante a redução parcial de oxigênio molecular no processo de produção de ATP. A medida que as reações dentro da célula ocorrem, o oxigênio sofre reduções parciais, assumindo conformações como  $O_2^*$  (singlet),  $\bullet O_2^-$  (superóxido),  $H_2O_2$  (peróxido de oxigênio) e  $OH\bullet$  (hidroxila) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015). Uma vez ativado, o oxigênio molecular pode reagir com outras moléculas orgânicas ou metais de transição (BREUSEGEM *et al.*, 2001).

Durante tais etapas, se houver um desbalanço na quantidade de EROs, sejam elas dispersas, ou oriundas da entrada de elétrons pela cadeia respiratória, os níveis de elétrons dispersos se elevam e a mitocôndria pode apresentar estresse oxidativo (NELSON e COX, 2017). Em baixas quantidades as EROs não são prejudiciais ao organismo pois podem ser utilizadas para detecção de condições de hipóxia (NELSON e COX, 2017).

Para minimizar possíveis danos relativos ao estresse oxidativo, as células possuem diversos mecanismos que possibilitam diminuir a toxicidade dessas moléculas. Caso esse sistema esteja prejudicado ou a concentração de moléculas tóxicas sature os sítios ativos das enzimas, consequências podem ser identificadas. Entre tais consequências estão: alterações na atividade de enzimas (WEISS, 1961), lesões ao nível celular (SHAN E JONES, 1990), envelhecimento, mutações, câncer, doenças autoimunes, entre outros (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015).

As enzimas do sistema antioxidante estão envolvidas na eliminação de espécies reativas ao oxigênio, além de combater os efeitos causados pela entrada de xenobióticos nas células. As contaminações por pesticidas, por exemplo, podem ocasionar o aumento de EROs, alterando o sinergismo das reações de defesas antioxidantes (JOHN *et al.*, 2001; MONTEIRO *et al.*, 2006). Estas alterações podem estar envolvidas a danos celulares irreversíveis devido aos agravos aos ácidos nucleicos, aos fosfolipídios e às proteínas (GRIVENNIKOVA e VINOGRADOV, 2006; VALKO *et al.*, 2006).

Durante a fosforilação oxidativa o oxigênio pode assumir conformações diferentes, sendo algumas delas consideradas altamente tóxicas, como o superóxido que é um radical altamente reativo. Quando radicais superóxidos são produzidos nas células, enzimas especializadas fazem a sua dismutação. É o caso da superóxido dismutase (SOD), que converte o radical superóxido em  $H_2O_2$  e  $H_2O$  (BRAND, 2010).

O  $H_2O_2$  formado pode também ser tóxico a célula. Por isso, após a sua formação, enzimas como catalases (CAT) ou Glutathione Peroxidase (GPx) têm a capacidade de converter o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. A CAT está presente nos peroxissomos das células (AEBI, 1984; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015).

Como citado anteriormente, a glutathione peroxidase (GPx) tem função similar a CAT, pois também utiliza o peróxido de hidrogênio como substrato para suas reações, porém se diferencia da catalase por oxidar a glutathione reduzida (GSH) a glutathione oxidada (GSSG) (FLOHÉ e GÜNZLER, 1984).

Entre os outros exemplos de enzimas do sistema antioxidante, estão as glutathione redutase (GR). Uma vez que a glutathione oxidada é formada, a GR recicla a GSSG em GSH, utilizando o NADPH como substrato. A GR está presente na maioria das células (CHANG *et al.*, 1978; DORVAL e HONTELA, 2003).

Por fim, a glutathione-S- transferase (GST) tem como principal função detoxificar substâncias, pois, as moléculas formadas são menos reativas e tem uma maior facilidade de excreção (MANNERVIK e JEMTH, 2001). A GST é um agente detoxificante de fase II, e tem a capacidade de detoxificar agentes alquilantes (quebrantes de DNA), compostos fármacos, entre outros. A sua utilização como um indicador biológico em testes para a qualidade ambiental pode ser útil (TAVAZZI *et al.*, 2000).

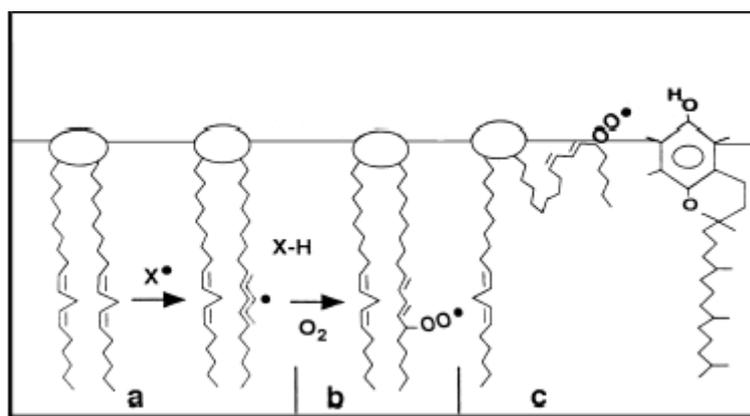
## 2.4 DISTURBIOS CELULARES DECORRENTES DA ALTERAÇÃO DO METABOLISMO ENERGÉTICO E SISTEMA ANTIOXIDANTE

### 2.4.1 Estresse Oxidativo Mensurado Por Lipoperoxidação

Os radicais livres podem promover outros efeitos adversos nas células, como dano oxidativo aos lipídios. A membrana celular é composta

principalmente de ácidos graxos polinsaturados (PUFAs), sendo que estes podem sofrer oxidação facilmente, o que promove modificações na membrana. A oxidação dos PUFAs pode ocorrer por mecanismos enzimáticos ou não enzimáticos. Os enzimáticos são controlados por lipoxigenases, cicloxigenases, citocromo P450 e heme-peroxidase. No entanto, a oxidação não enzimática dos PUFAs reage com radicais, iniciando o processo de lipoperoxidação (LPO) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015; YIN e POTER, 2005). A lipoperoxidação tem como consequência a perda irreversível da fluidez e da elasticidade da membrana, o que pode ocasionar a lise dessa estrutura (Fig. 6).

A LPO possui três etapas: a iniciação, a propagação e a terminação. A iniciação é causada pela ação de uma ERO a um ácido graxo constituinte da membrana celular, o qual apresenta reatividade suficiente para sequestrar um átomo de hidrogênio. Na etapa de propagação, a reação de radicais lipídicos com  $O_2$  é seguida da formação de radicais peroxila, que sequestra hidrogênio formando outros radicais lipídicos. A etapa de terminação da reação de LPO ocorre quando os radicais, produzidos nas etapas anteriores, unem-se, formando espécies não radicalares, ou radicalares através da aceitação de um átomo de hidrogênio (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2015).



**Figura 6:** Fases da reação de lipoperoxidação, iniciação, propagação e finalização. (<http://envelhecimentounb94.blogspot.com/2011/10/senescencia-da-membrana-plasmatica.html>)

## 2.5 Inativação das Enzimas Colinesterases

As colinesterases são divididas em dois tipos, as acetilcolinesterases (AChE) e as butirilcolinesterases (BChE). As AChE são abundantes no cérebro,

músculo e eritrócitos (DAVE *et al*, 2000; PRODY *et al.*, 1987), e sua principal função é fazer a lise das acetilcolinas das fendas sinápticas, controlando as contrações musculares. A inativação das AChE pode implicar na diminuição da mobilidade, ou na paralisia muscular (MONTEIRO *et al.*, 2005; RAVEH *et al.*, 1993).

As BChE são frequentes no fígado, plasma, intestino, coração, rim e pulmão (DAVE *et al*, 2000; PRODY *et al.*, 1987), e têm como função hidrolisar substâncias tóxicas, principalmente fármacos e drogas como cocaína (LYNCH *et al.*, 1997), a aspirina (MASSON *et al.*, 1998) e a heroína (LOCKRIDGE *et al.*, 1980), assim como também a lise da acetilcolina das fendas sinápticas.

Inseticidas como os organofosforados e carbamatos, são considerados anticolinesterásicos, pois diminuem a atividade das colinesterases no cérebro e nos músculos de invertebrados e vertebrados (NACHMANSOHN E ROTHENBERG, 1945). Tal dano já foi detectado em peixes, acompanhados também de lesões hepáticas (OLIVEIRA *et al.*, 2012). Além dos inseticidas, herbicidas a base de glifosato e piretróides, como a fenpropatrina, podem reduzir a atividade dessas enzimas, mesmo quando expostas a baixas concentrações (BENAE *et al.*, 2014; FERREIRA *et al.*, 2010).

## 2.6 OBJETO EM ESTUDO

No presente estudo avaliaremos a espécie *Rhamdia quelen*. Esta espécie pertence à Classe *Osteichthyes*, Série *Teleostei*, Ordem *Siluriformes*, Família *Pimelodidae*, Gênero *Rhamdia* e Espécie *Rhamdia quelen* (SILFVERGRIP e NATURHISTORISKA, 1996). O habitat de preferência da espécie são os locais profundos dos lagos, ou os fundos dos poços, em meio à vegetação, ou troncos envelhecidos, apresentando tendência à aversão a luminosidade (PIAIA *et al.*, 1999). É considerada euriérmica, pois tem a capacidade térmica de suportar temperaturas entre 15 a 34°C (CHIPPARI-GOMES e GOMES, 1999), porém a temperatura ideal para maiores taxas de massa corpórea e melhores resultados na piscicultura é 24 e 30°C (ANDREWS *et al.*, 1972). A amplitude de concentração de oxigênio dissolvida suportada fica entre 5,64 a 7,05 (GOMES *et al.*, 2000). A espécie *Rhamdia quelen* é considerada estenoalina suportando uma capacidade de até 9,0 g/L de NaCl em teste de 96 horas de experimentação

(MARCHIORO e BALDISSEROTTO, 1999). Alevinos dessa espécie suportam uma variação de pH da água entre 4,0 e 8,5 (FERREIRA *et al.*, 2001).

Ao considerar nosso objeto de estudo, *Rhamdia quelen* foi utilizada por se tratar de uma espécie nativa da região do Sul do Brasil, e por ser uma das mais promissoras para o cultivo em tanques. Tal fato é decorrente a sua alta resistência durante o manejo e ampla aceitação pelo consumidor (CARNEIRO *et al.*, 2002).

Os jundiás possuem períodos de desenvolvimento embrionário definidos. As fases de desenvolvimento são: zigoto, clivagem, blástula, gástrula, segmentação, farínghula, eclosão e larva. Essas fases totalizam um período de tempo de 90 horas após a fertilização (RODRIGUES-GUALDINO *et al.*, 2009). Para analisar todo o período de desenvolvimento larval, algumas etapas são importantes a serem citadas.

Em 12 horas de desenvolvimento em uma temperatura de 25°C, o animal se encontra nas interfases entre gástrula e segmentação. Nesse período, estruturas importantes para a sustentação do embrião e sistema nervoso primordial estão praticamente formados (OLIVEIRA *et al.*, 2007). O animal apresenta diferenciação das lentes, placóides óticos (primórdios dos ouvidos internos), mesencéfalo e começa a se projetar por meio de espasmos musculares (ARAÚJO, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2007; RODRIGUES-GALDINO *et al.*, 2009).

Nas fases próximas, mais precisamente por volta de 24 horas de desenvolvimento, o *R. quelen* apresenta cauda com baixa mobilidade dentro do córion e se prepara para a eclosão. Nesse estágio, boca e ânus ainda estão fechados, as circulações aferentes e eferentes iniciam, e o intestino médio está formado e visível. O animal passa então para um período de preparação para a eclosão (ARAÚJO, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2007; RODRIGUES-GALDINO *et al.*, 2009).

Embora no estágio de farínghula tardia (em torno de 21 horas) não tenha ocorrido a eclosão, existem suposições de que o embrião a abertura bucal, nesse período a alimentação endógena ainda é essencial para a maturação das estruturas digestivas, que servem para que o animal consiga alcançar locais com recursos disponíveis (RODRIGUES-GALDINO *et al.*, 2009).

Em 36 horas estruturas como os olhos pigmentados, boca elíptica, primórdios dos barbilhões estão formados, além de poro anal e opérculos se encontrarem abertos. Os animais também apresentam bolsa faríngeas e início do desenvolvimento de neuromastos no tronco e região encefálica. (ARAÚJO, 2011; OLIVEIRA *et al*, 2007; RODRIGUES-GALDINO *et al.*, 2009).

Nas horas seguintes, por voltas de 72 horas de desenvolvimento após a fecundação, as larvas apresentam os lábios bem definidos, e os botões gustativos formados. Mas é somente, nos horários posteriores que ocorre o início evidente da alimentação exclusivamente exógena (RODRIGUES-GALDINO *et al*, 2009).

### 2.5.1 Efeito do Uso de Agrotóxicos Sobre o Desenvolvimento Embrionário de Peixes

Diante das afirmações de que os agrotóxicos podem ter efeitos adversos sobre os processos biológicos de animais não-alvos, estudos também são necessários para caracterizar todos os estágios de desenvolvimento afetados por estes compostos químicos. Os estágios iniciais se destacam por se tratarem do momento de formação das estruturas necessárias para a manutenção da vida do organismo. Uma vez que estes estágios sejam alterados, pode haver o comprometimento das próximas fases (REIS-FILHO *et al.*, 2007)

Agrotóxicos frequentemente são relatados por causar alterações fisiológicas em inúmeras espécies de peixes, inclusive em *Rhamdia quelen*. Sobjak *et al.* (2017) observaram que o glifosato induz a atividade precoce de ChE nas fases iniciais de desenvolvimento, aumento da atividade de GST e danos oxidativos observados por meio do aumento da LPO. O glifosato também foi descrito como modulador da atividade de enzimas como a catalase, diminuindo suas taxas, causando vacuolização, infiltração de leucócitos e degeneração do citoplasmas (MURUSSI *et al.*, 2015).

Zebral e colaboradores (2017) avaliaram os efeitos de glifosato nas primeiras horas de desenvolvimento de *Odontesthes humensis*. Após 96h de exposição foram observados os efeitos significativos: redução no tamanho dos olhos, interrupção no metabolismo do ácido retinóico e aumento da mortalidade.

Além dos efeitos supracitados da exposição de *R. quelen* a agrotóxicos, há inúmeros outros exemplos de alterações no desenvolvimento de espécies de

peixes expostas a agrotóxicos. *Cyprinus carpio*, quando exposto ao inseticida neonicotinoide tiaclopride durante as primeiras fases, apresentou atraso em seu desenvolvimento, menor crescimento, esteatose difusa no fígado e diminuição da atividade de enzimas como a Glutathione redutase (GR) (VELISEK e STARA, 2018).

Fungicidas podem também causar alterações no desenvolvimento de *Danio rerio* nos estágios iniciais de desenvolvimento, sendo que Jia *et al.* (2018) concluíram que azoxistrobina e picoxistrobina induzem o estresse oxidativo no fígado desta espécie e causam más formações no corpo.

Outros estudos indicam que organofosforados, como o clorpirifós e o diazinon, afetam o desenvolvimento de *Danio rerio*. Segundo Cao *et al.* (2018), os efeitos colaterais causados por esses compostos em *D. rerio* são a diminuição na taxa de eclosão e na bioenergética mitocondrial, lordose espinhal nas larvas, edema pericárdio, atraso na incubação e inibição da atividade da AChE, o que diminui a capacidade de locomoção.

## REFERÊNCIAS

AEBI, H. Oxygen Radicals in Biological Systems. **Methods in Enzymology**, v. 105, n. 1947, p. 121–126, 1984.

ALBERTS, B. **Biologia molecular da célula**. Porto Alegre: 1294P, 2017.

ANDREWS, J. W.; KNIGHT, L. H.; MURAI, T. Temperature Requirements for High Density Rearing of Channel Catfish from Fingerling to Market Size. **The Progressive Fish-Culturist**, v. 34, n. 4, p. 240–241, 1972.

ARAÚJO, A. A. **Desenvolvimento do sistema sensorial de jundiá *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae)**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Curitiba.

BANAEE, M. Alterations in biochemical parameters of the freshwater fish, *Alburnus mossulensis*, exposed to sub-lethal concentrations of Fenprothrin. **International Journal of Aquatic Biology**, v. 2, n. 2, p. 58–68, 2014.

BUEGE, J. A., AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 129, p. 302–310, 1975.

BURIGO, A., Impacto dos Agrotóxicos na alimentação, saúde e meio ambiente. In: **Oficina Agrotóxicos: impactos e alternativas**. Furnas, p. 30, 2016

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BRAND, M. D. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. **Experimental Gerontology**, v. 45, n. 7–8, p. 466–472, 2010.

BRASIL, Constituição (1850), Lei nº 601, decreto nº 1318 de 30.1.1854. Disponível em: [https://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/lim/lim601.htm](https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/lim/lim601.htm)

BRASIL, Constituição (1989), Lei nº 7.802, disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/LEIS/L7802.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/L7802.htm)

BREUSEGEM, F. VAN; JAMES, E.V; DIRKLNZÉ, F.D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **plant Science**, v. 161, p. 405–414, 2001.

CAMPBELL MK, FARRELL SO. **Bioquímica**. 2ª ed. São Paulo: Cengage Learning; 2017a. Capítulo 17. Glicólise; p. 481-510.

CAMPBELL MK, FARRELL SO. **Bioquímica**. 2ª ed. São Paulo: Cengage Learning; 2017b. Capítulo 19. Ciclo do ácido cítrico; p. 539-68.

CARNEIRO, P.C.F.; BENDHACK, F.; MIKOS, J.D.; SHORER, M.; OLIVEIRA FILHO, P.R.C.; BALDISSEROTTO, B.; GOLOMBIESKI, J.; SILVA, I.V.F.; MIRON, D.; ESQUIVEL, B.M.; GARCIA, J.R.E. Jundiá: Um grande peixe para a região sul. **Panorama da Aqüicultura** v.12, n.69, p.41-46, 2002.

CARNEIRO, P.C.F. A produção do jundiá em cativeiro. In: BALDISSEROTTO, B.; RADÚNZ NETO, J. **Criação de jundiá**. Santa Maria: UFSM, p.117-141, 2004.

CARVALHO, C. DOS S.; FERNANDES, M. N. Effect of copper on liver key enzymes of anaerobic glucose metabolism from freshwater tropical fish

Prochilodus lineatus. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 151, n. 3, p. 437–442, 2007.

CHANG, J. C.; VAN DER HOEVEN, L. H.; HADDOX, C. H. Glutathione reductase in the red blood cells. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, v. 8, n. 1, p. 23–29, 1978.

CHIPPARI-GOMES, A. R.; GOMES, L. C. Lethal Temperatures for Silver Catfish, *Rhamdia quelen*, Fingerlings. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 9, n. 4, p. 11–21, 1999.

DAVE K.R., SYAL A.R., KATYARE S.S. Tissue cholinesterases. A comparative study of their kinetic properties. **Zeitschrift für Naturforschung** 5. 55c, 100-108, 2000.

DO AMARAL, A. M. B. et al. Seasonal implications on toxicity biomarkers of *Loricariichthys anus* (Valenciennes, 1835) from a subtropical reservoir. **Chemosphere**, v. 191, p. 876–885, 2018.

DORVAL, J.; HONTELA, A. Role of glutathione redox cycle and catalase in defense against oxidative stress induced by endosulfan in adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 192, n. 2, p. 191–200, 15 out. 2003.

EDER, K. J, KÖHLER, H. R., WERNER, I., pesticide and pathogen: heat shock protein expression and acetylcholinesterase inhibition in juvenile chinook salmon in Response to multiple stressors. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v 26, n 6, p. 1233-1242, 2007.

FERREIRA, A. A.; NUÑER, A. P. DE O.; ESQUIVEL, J. R. Influência do pH sobre ovos e larvas de jundiá, *Rhamdia quelen*. **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 2, p. 477–481, 2001.

FERREIRA, D.; MOTTA, A. C; KREUTZ, L. C; TONI, C; LORO, V. L; BARCELLOS, L. J. G. Assessment of oxidative stress in *Rhamdia quelen* exposed to agrichemicals. **Chemosphere**, v. 79, n. 9, p. 914–921, 2010.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61–68, 1997.

FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods in enzymology**, v. 105, p. 114–21, 1984.

GASPAR, Lúcia. *Reforma Agrária no Brasil*. **Pesquisa Escolar Online**, Fundação Joaquim Nabuco, Recife. Disponível em: <<http://basilio.fundaj.gov.br/pesquisaescolar/>>. Acesso em: 20.01.20

GRIVENNIKOVA, V. G.; VINOGRADOV, A. D. Generation of superoxide by the mitochondrial Complex I. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1757, n. 5–6, p. 553–561, 2006.

HALLIWELL, B. AND GUTTERIDGE, J.M.C. (2015) *Free Radicals in Biology and Medicine*. 5th Edition, Oxford University Press, New York.

ICHIBA, S. H. K. Variabilidade da temperatura máxima, média e mínima para o estado do paraná. **Anais do XI Simpósio Brasileiro de Geografia Física Aplicada**, p. 3195–3206, 2005.

JIA, W., MAO, L., ZHANG, L., ZHANG, Y., JIANG, H. Effects of two strobilurins (azoxystrobin and picoxystrobin) on embryonic development and enzyme activities in juveniles and adult fish livers of zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 207, p. 573-580, 2018.

JOHN, S; KALE, M; RATHORE, N; BHATNAGAR, D. Protective effect of vitamin E in dimethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 12, n. 9, p. 500–504, 2001.

KAMLER, E. Ontogeny of yolk-feeding fish: an ecological perspective. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.12, p.79-103, 2002.

KUETTNER, E. B. Crystal structure of hexokinase KIHxk1 of *kluveromyces lactis*: A molecular basis for understanding the control of yeast hexokinase functions via covalent modification and oligomerization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 52, p. 41019–41033, 24 dez. 2010.

LYNCH, T. J., MATTES, C. E., SINGH, A., BRADLEY, R. M., BRADY, R. O., DRETCHEN, K. L. Cocaine Detoxification by Human Plasma Butyrylcholinesterase. **Toxicology and applied pharmacology**. 145, 363–371, 1997.

LOCKRIDGE O., MOTTERSHOW-JACKSON N., ECKERSON H.W., LADU B.N. Hydrolysis of diacetylmorphine (heroin) by human serum cholinesterase. **Journal Pharmacology**. v 215, 1-8, 1980.

MAURICE, C. F.; HAISER J.H; TURNBAUGH, P.J. Xenobiotics Shape the Physiology and Gene Expression of Active Human Gut Microbiome; **Elsevier Inc**, p.39-50, 2013.

MANNERVIK, B.; JEMTH, P. Measurement of glutathione transferases. **Curr Protoc Toxicol**, v. 6, p. 6–10, 2001.

MARCHIORO, M. I.; BALDISSEROTTO, B. SOBREVIVÊNCIA DE ALEVINOS DE JUNDIÁ (*Rhamdia quelen* QUOY & GAIMARD, 1824). À VARIÇÃO DE SALINIDADE DA ÁGUA. v. 29, n. 2, p. 315–318, 1999.

MASSON P., FROMENT M.-T., FORTIER P.-L., VISICCHIO J.-E., BARTELS C.F., LOCKRIDGE O. Butyrylcholinesterase-catalysed hydrolysis of aspirin, a negatively charged ester, and aspirin related neutral esters. **Biochimica et Biophysica Acta**, v 1387, p. 41-52, 1998.

MELO, A. S.; HEPP, L. U. Ferramentas Estatísticas Para Análises De Dados Provenientes De Biomonitoramento. **Oecologia Australis**, v. 12, n. 03, p. 463–486, 2008.

MELO, V. DE F. MOURA, R., TOLEDO, F. H.; LIMA, V. C.; GHIDIN. Morfologia de agregados de latossolos bruno e vermelho do estado do Paraná, avaliada por imagens obtidas em scanner. **Revista Brasileira de ciência do solo**, v. 32, p. 85–99, 2007.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, Plano Nacional de Recursos Hídricos. Águas para o futuro: cenários para 2020: Volume 2 / Ministério do Meio Ambiente, **Secretaria de Recursos Hídricos**. Brasília, 2006.

MONTEIRO, D. A. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 143, n. 2, p. 141–149, 2006.

MURUSSI, C. R., COSTA, M. D., LEITEMPERGER, J. W., GUERRA, L., RODRIGUES, C. C. R., MENEZES, C. C., SEVERO, E. S., FLORES-LOPES, F., SALBEGO, J., LORO, V. L. Exposure to diferente glyphosato formulations on the

oxidative and histological status of *Rhamdia quelen*. **Fish Physiol biochem** v. 42, p. 445-455, 2016.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 6a. ed. Ediciones Omega, 2015.

OLIVEIRA, I. R., SILVEIRA, A. N., BUZOLLO, H., Desenvolvimento embrionário do jundiá. **Departamento de Biologia e Zootecnia**. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – Campus de Ilha Solteira, 2007.

OLIVEIRA, A. V. DE S. Biomonitoramento da qualidade de água no rio Poxim Açu, São Cristóvão, Sergipe. **Congresso norte nordeste de pesquisa e inovação**, 2012.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DA SAÚDE/ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Representação do Brasil. **Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos**. Brasília, 1996.

PERZ, R.C.; VAN LISHAUT, H.; SCHWACK, W. CS2 Blinds in Brassica Crops: False Positive Results in the Dithiocarbamate Residue Analysis by the Acid Digestion **Methodology Journal Agriculture Food Chemycals**. v. 48, p. 792–796, 2000.

PIAIA, R.; TOWNSEND, C. R.; BALDISSEROTTO, B. Growth and survival of fingerlings of *Rhamdia quelen* exposed to different light regimes. **Aquaculture International**, v. 7, p. 201–205, 1999.

PRODY C.A., ZEVIN-SONKIN D., GNATT A., GOLDBERG O., SOREQ H. Isolation and characterization of full-length cDNA clones coding for cholinesterase from fetal human tissues. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v 84, p 3555-3559, 1987.

RAVEH L., GRUNWALD J., MARCUS D., PAPIER Y., COHEN E., ASHANI Y. Human butyrylcholinesterase as a general prophylactic antidote for nerve agent toxicity: In vitro and in vivo quantitative characterization. **Biochemical Pharmacologic**. v 45, p. 2465-2474, 1993.

REBELO, R. M. **Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: uma abordagem ambiental**. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/sophia/cnia/livros/produtosagrototoxicoseafinscomercializadosem2009nobrasildigital.pdf>>. Acesso em: 31 jul. 2018.

REIS-FILHO, R. W.; SANTOS, L. R.; VIEIRA, E. M. Poluentes emergentes como desreguladores endócrinos. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, São Paulo, v. 2, p. 283-288, 2007.

RODRIGUES-GALDINO, A. M., MAIOLINO, C. V., FORGATI, M. DONATTI, L., MIKOS, J. D., CARNEIRO, P. C. F., RIOS, F. S. A. Development of the neotropical catfish *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) incubated in diferente temperature regimes. **Zygote**, v. 18, p. 131-144, 2009.

SECRETARIA MEIO AMBIENTE (SEMA), 2004. Disponível em: <http://www.geografia.seed.pr.gov.br/modules/galeria/detalhe.php?foto=1573&evento=8> Acesso em 10/10/2019

SILFVERGRIP, A. M. C.; A systematic revision of the Neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae). **Naturhistoriska riksmuseet (sweden)**. Swedish Museum of Natural History, 1996.

SINGH, B. K.; WALKER, A. Microbial degradation of organophosphorus compounds. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, n. 3, p. 428–471, 2006.

SILFVERGRIP, A. M. C.; NATURHISTORISKA RIKSMUSEET (SWEDEN). **A systematic revision of the Neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae)**. Department of Zoology, University of Stockholm and Department of Vertebrate Zoology, Swedish Museum of Natural History, p.192, 1996.

SCARIOT, F. J. **Efeito dos fungicidas mancozeb, captan, dithianon sobre *saccharomyces cerevisiae***. Dissertação. Programa de Pós-graduação em biotecnologia. Caxias do Sul, 2016.

SHAN, X.; AW, T. Y.; JONES, D. P. Glutathione-dependet protection against oxidative injury. **Pharmacol Ther.** v. 47, p. 61–71, 1990.

SHEPHERD, D.; GARLAND, P. B. **The Kinetic Properties of Citrate Synthase from Rat Liver.** **Journal Mitochondria Biochemical.**

TAVAZZI, B. et al. Energy metabolism and lipid peroxidation of human erythrocytes as a function of increased oxidative stress. v. 689, p. 684–689, 2000.

VALKO, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, n. 1, p. 1–40, 2006.

VELISEK, J., STARA, A. Effect of thiacloprid on early life stages of common carp (*Cyprinus carpio*). **Chemosphere**. v. 194, p. 481-487, 2018.

VOET D, VOET JG. **Bioquímica**. 4ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2013b. Capítulo 21, O ciclo do ácido cítrico; p. 789-822.

WEISS, C. M. Physiological Effect of Organic Phosphorus Insecticides on Several Species of Fish. **Changed publisher: Wiley**, 1961.

WOYNAROVICH, E. A propagação artificial de peixes de águas tropicais : manual de extensão. 1983.

WHO (World Health Organization). Public health impact of pesticides used in agriculture. Genebra: **World Health Organization**, 1990.

YIN, H.; PORTER, N. A. New insights regarding the antioxidantation of polyunsaturated fatty acids. **Antioxidants & Redox Signaling** 7, 170-184, 2005.

ZAKHARTSEV, M. Effects of temperature acclimation on lactate dehydrogenase of cod (*Gadus morhua*): genetic, kinetic and thermodynamic aspects. **The Journal of Experimental Biology**, v. 207, p. 95–112, 2004.

ZANIBONI-FILHO, E. Piscicultura das espécies nativas de água doce. POLI, CR, ATB POLI, E ANDREATTA, E BELTRAME. **Aquicultura: experiências brasileiras**. Florianópolis: Multitarefa, v 1, p. 337-368, 2004.

ZEBRAL, Y. D., COSTA, P. G., KNOPP, B. C., LANSINI, L. R., ZAFALON-SILVA, B., BRIANCHINI, A., ROBALDO, R.B. Effects of a glyphosate-based herbicide in pejerrey *Odontesthes humensis* embryonic development. **Chemosphere**. v 185, p. 860-867, 2017.

**Capítulo 1*****Alterações metabólicas do desenvolvimento embrionário de Rhamdia  
quelen em exposição a águas de riachos com diferenças de uso e  
ocupação de solo***

---

A ser enviado para a revista Chemosphere

## **Alterações metabólicas do desenvolvimento embrionário de *Rhamdia quelen* em exposição a águas de riachos com diferenças de uso e ocupação de solo**

Camila Maria Toigo de Oliveira Piffero<sup>1\*</sup>, Silvia Romão<sup>2</sup>, Luisa Cazarolli<sup>2</sup>, Ana Tereza Bittencourt Guimarães<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Conservation and Management of Natural Resources Postgraduate Program, Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Cascavel – PR.

<sup>2</sup> Universidade Federal da Fronteira Sul. Laranjeiras do Sul – PR.

<sup>3</sup> Biosciences and Health Postgraduate Program, Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Cascavel – PR.

\* camila.toigo@outlook.com

### **Resumo**

A ocupação antrópica de terras destinadas à agricultura pode causar efeitos negativos ao meio ambiente. Constantemente compostos químicos utilizados nestas atividades são lixiviados até corpos d'águas onde podem promover potenciais danos em organismos não-alvos. *Rhamdia quelen* é uma espécie nativa e foi utilizada como bioindicadora da qualidade desses ambientes na região do Oeste paraná em um riacho considerado impactado (Tormenta) e outro preservado (Manoel Gomes). As análises ocorreram 12h, 24h, 48h e 72h após a fecundação do ovócito. Foram encontrados resultados significativos na atividade das enzimas do metabolismo energético (HK, PFK, LDH, CS, MDH) e sistema antioxidante (CAT, GPx, GR, GST) no rio impactado quando comparado com o rio referência. Além disso, danos foram encontrados por meio do aumento da reação de lipoperoxidação e inibição de enzimas colinesterases. Os efeitos causados por agrotóxicos podem ser diversos, locais com utilização constante desses compostos perturbam os estágios iniciais de desenvolvimento e alteram atividades enzimáticas metabólicas e de defesa do organismo.

**Palavras-chave:** pesticidas, sistema antioxidante, metabolismo energético, jundiá

### **1. Introdução**

O sucesso na produtividade do setor agrícola é acompanhado pelo aumento do uso de agrotóxicos nas plantações (Rebello et al., 2010). Esses compostos químicos são depositados nos solos e em seguida sofrem lixiviação, chegando até corpos d'água onde provocam efeitos negativos, como danos celulares em ácidos nucleicos e fosfolipídios em organismos não-alvos (Grivennikova and Vinogradov, 2006; Valko et al., 2006). Podem ainda causar diminuição do *fitness* e o seu declínio (Buriço and Venâncio, 2016). As análises desses efeitos em organismos nos estágios iniciais de desenvolvimento são

importantes, pois esses compostos afetam especialmente os estágios iniciais de desenvolvimento e culminam em maior risco de mortalidade em estágios posteriores (Eder et al., 2007). A região oeste do Paraná é referência na produção agrícola e pode ser utilizada como modelo para testar níveis de contaminação em espécies de peixes nativas. Para tanto, *Rhamdia quelen* é um útil bioindicador, pois é uma espécie nativa, com alta tolerância ao frio e promissora no mercado consumidor (Zaboni-Filho, 2004; Carneiro et al., 2015). Em relação os biomarcadores a quantificação das modulações nas atividades enzimáticas como também por meio da detecção dos danos fisiológicos se torna útil para análises (Halliwell e Gutteridge, 2015).

Diante do exposto, o presente estudo tem por objetivo avaliar os efeitos metabólicos da exposição de embriões de *Rhamdia quelen* às águas de dois riachos com diferenças de uso e ocupação de solo.

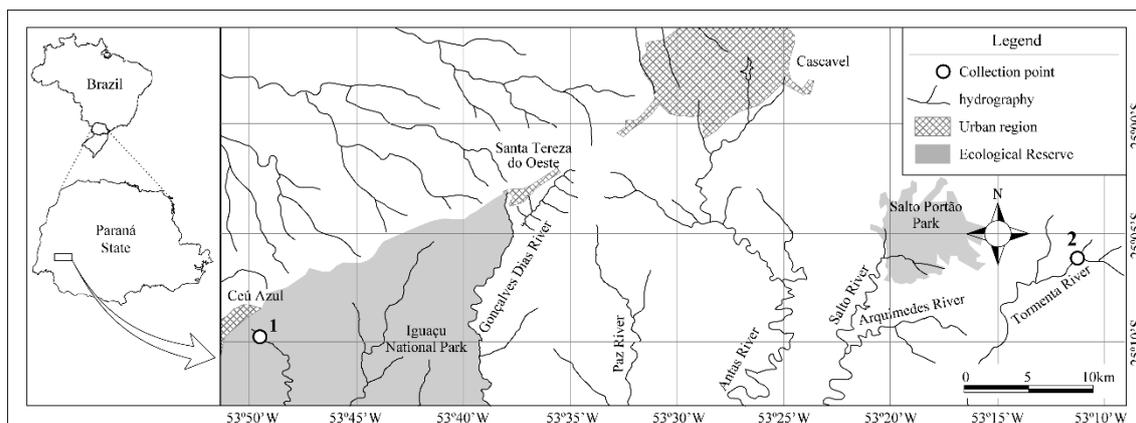
## **2. Metodologia**

### *2.1 Área de Estudo*

O estudo foi realizado na região do oeste do Paraná, em riachos pertencentes a bacia do Baixo Iguaçu, considerados de 2ª ordem: Rio Manoel Gomes e Rio Tormenta.

Os pontos geográficos onde foram coletadas as águas para experimentação apresentam características ambientais diferentes. O rio Manoel Gomes foi considerado como referência (REF) por estar localizado dentro do Parque Nacional do Iguaçu (25°09.723'S, 53°49.768' W, Fig. 1), que é uma importante unidade de conservação brasileira. A microbacia do rio Manoel Gomes contém 96% de cobertura vegetal em seu entorno (Global Forest Watch, 2019).

O rio Tormenta (25°28.59'S, 53°22' W, Fig. 1) apresenta 26,5% de cobertura vegetal em seu entorno (Global Forest Watch, 2019), e está localizado em uma ampla área rural adjacente ao seu curso d'água. Este riacho foi considerado como impactado (IMP) devido às características de uso e ocupação do solo de sua microbacia.



**Figura 1.** Mapa com as localizações dos rios Manoel Gomes (1), considerado como ambiente referência, e do rio Tormenta (2), considerado como rio impactado.

## 2.2 Desenho experimental

Inicialmente foi realizado o processo de fertilização de ovócitos de acordo com o proposto por Pereira e colaboradores (2006). A coleta de machos e fêmeas foi realizada no período reprodutivo, designado entre os meses de setembro e março (Gomes et al., 2000a). Os peixes coletados foram mantidos em tanques de 100 litros, com aeração constante e temperatura ambiente. O tratamento hormonal para a indução da desova e posterior extrusão dos ovócitos foi realizado com extrato hipofisário de carpa (Wojnarovich, 1983). Seringas foram utilizadas na abertura genital dos machos para a coleta dos espermatozoides, pós-massagem abdominal. Foram escolhidos os ovócitos e espermatozoides de apenas uma fêmea e um machos, respectivamente, para garantir a homogeneidade da prole provinda de apenas um casal.

Após a extrusão dos ovócitos foram adicionados espermatozoides em uma relação média de um ovócito para 89.000 espermatozoides, a fim de que ocorresse a fertilização. Após a fertilização, os ovos foram acondicionados em incubadoras (*fishboiler*) de acordo com os rios onde foram coletadas as águas no mês de fevereiro. As águas dos dois riachos foram consideradas como tratamentos, sendo preparadas seis incubadoras para cada horário de desenvolvimento (12h, 24h, 48h e 72h). As incubadoras tiveram aeração constante mantendo a oxigenação da água ( $6 \pm 1 \text{mg/L}$ ), controle de temperatura ( $24 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ) e de pH ( $7,50 \pm 0,5$ ), bem como foram realizadas avaliações a cada 6 horas das variáveis Nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), Nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e Amônia ( $\text{NH}_3$ ). As coletas do material biológico ocorreram nos horários supracitados, sendo calculados os percentuais de organismos vivos (% viabilidade) e análises morfométricas. Para este processo, as amostras de ovos e larvas foram fixadas em formol 10% e conservadas em álcool 70%, foram colocadas

sobre uma lâmina e posteriormente, retiradas fotomicrografias com auxílio do Fotomicroscópio Ótico BX 60 com câmera digital DP71. Após a obtenção das imagens, foi realizada a mensuração dos ovos e larvas com auxílio do programa ImageJ, realizadas medidas da área total das larvas em 24, 48 e 72 h.

### 2.3 Análises Bioquímicas

Em cada um dos horários de experimentação foram coletados ovos ou larvas das respectivas réplicas, sendo posteriormente homogeneizadas em tampão tris-HCl pH 7,0, centrifugadas em microcentrífuga a 12.000 g e 4°C, durante 12 minutos e posteriormente, foram acondicionadas em ultrafreezer -80°C. No momento das análises descritas a seguir, as amostras foram descongeladas, mas mantidas resfriadas durante todos os procedimentos. A determinação de proteínas seguiu o método de Bradford (1976) utilizando como padrão soro albumina bovina e leitura em comprimento de onda 595 nm.

#### 2.4.1 Metabolismo Energético

A avaliação da atividade da enzima Hexoquinase (HK) foi feita pelo método de Baldwin *et al.*, (2007). A composição do sistema de reação se baseou na presença de Tampão Imidazol (pH 7,4), glucose 20 mM, ATP 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 10µM, NADP<sup>+</sup> 0,4mM, DTT 1 mM, KCl 2 mM, G-6-PDH 0,3U e H<sub>2</sub>O desionizada. Assim que o sistema de reação foi adicionado às amostras, a microplaca foi imediatamente analisada durante 8 minutos a 340nm em intervalos de 21 segundos. A atividade desta enzima foi expressa em Unidade de NADP<sup>+</sup> reduzido . min<sup>-1</sup> . mg de proteína<sup>-1</sup>.

O sistema de reação para medição da enzima fosfofrutoquinase (Baldwin *et al.*, 2007) foi composto por tampão tris-HCl pH 8,2, água desionizada, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, ATP 1mM, NADH 0,15 µM, AMP 2mM, glicerofosfato desidrogenase 1U/mL, Aldolase 1,2 U/mL, triose fosfato isomerase 10 U/L e frutose-6-fosfato 5,0 mM. A atividade da enzima foi mensurada em espectrofotômetro a 340 nm, durante 8 minutos, em intervalos de 21 segundos, sendo os resultados expressos em NADH oxidado .min<sup>-1</sup>. mg de proteína<sup>-1</sup>.

A atividade enzimática da lactato desidrogenase (LDH) foi determinada por cinética a partir do decréscimo da absorbância de NADH devido a sua oxidação a NAD<sup>+</sup> (Thuesen *et al.*, 2005). O sistema de reação foi composto por tampão Tris-Hcl pH 7,4 50mM, Piruvato de Sódio 1,0mM, KCL 100mM, NADH 0,25mM e H<sub>2</sub>O desionizada. Quando o sistema de reação foi adicionado às amostras, a microplaca foi levada para leitura da absorbância a 340 nm, durante 8 minutos, em intervalos de 21 segundos. Os

resultados da atividade da LDH foram expressos em  $\text{NADH oxidado} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ .

O sistema de reação para avaliação da atividade enzimática da citrato sintase (CS) foi composto por dois tipos de soluções. Na solução 1 foi utilizado tampão tris-HCL pH 7,4 50 mM, KCl 100 mM, EDTA 1,0mM, DTNB (em tris) 200  $\mu\text{M}$ , Acetil-SCoA 200  $\mu\text{M}$ , H<sub>2</sub>O desionizada, e a solução 2 que é a solução de início de reação composta de Oxaloacetato 500  $\mu\text{M}$ . A atividade da CS foi determinada por método contínuo a partir da formação de ACoA-SH, formando-se um complexo com DTNB, realizando as leituras em 412 nm de comprimento de onda, durante 8 minutos, em intervalos de 21 segundos. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{moles de CoA-SH} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$  (Saborowski and Buchholz, 2002).

A malato desidrogenase (MDH) é a enzima final do Ciclo de Krebs, cuja função é a regeneração do oxaloacetato por meio da conversão de oxaloacetato em malato. Sua atividade foi medida por meio cinética, utilizando o método proposto por Childress & Somero (1979). Para tanto foi realizado um sistema de reação composto de tampão tris-HCl pH 7,4 50 mM, oxaloacetato 0,4 mM, MgCl<sub>2</sub> 20 mM, NADH 150  $\mu\text{M}$  e H<sub>2</sub>O desionizada. Assim que o sistema foi adicionado às amostras, foi feita a leitura de absorbância a 340 nm, por 8 minutos em intervalos de 21 segundos. Os resultados foram expressos em  $\text{NADH oxidado} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ .

#### 2.4.2 Sistema Antioxidante

A atividade da catalase (CAT) foi acompanhada pelo decréscimo da absorbância a 240 nm (Aebi, 1984) em sistema de reação constituído de tampão Tris-HCl 1,0 M, EDTA 5,0 mM, pH 8,0, água desionizada e 180  $\mu\text{l}$  de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%, d=1,1 g.ml<sup>-1</sup>, MM = 34 g.mol<sup>-1</sup>; concentração final no ensaio = 30 mM). A unidade para expressão da atividade da catalase foi mmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ .

A atividade da glutathiona peroxidase (GPx) foi avaliada de acordo com a técnica proposta por Flohé & Günzler (1984). A atividade enzimática foi acompanhada pelo decréscimo da absorbância do NADPH a 340 nm. O sistema de reação foi composto de tampão fosfato 100 mmol.L<sup>-1</sup> (pH 7,0) EDTA 1 mmol.L<sup>-1</sup>, GSH 2 mmol.L<sup>-1</sup>, NADPH 0,15 mmol.L<sup>-1</sup>, glutathiona redutase purificada 0,2U, t-butil hidroperóxido 0,5 mmol.L<sup>-1</sup>. A reação foi iniciada pela adição de t-butil-hidroperóxido e acompanhada durante 1 minuto. A GPx foi expressa em  $\mu\text{moles de NADPH oxidado} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ .

A atividade da glutatona redutase (GR) foi avaliada de acordo com a técnica proposta por Sies et al. (1979). O sistema de reação foi constituído de tampão fosfato 100 mmol.L<sup>-1</sup> (pH 7,0) EDTA 1 mmol.L<sup>-1</sup>, GSSG 0,66 mmol.L<sup>-1</sup>, NADPH 0,075 mmol.L<sup>-1</sup>. A reação foi iniciada pela adição de GSSG e acompanhada durante 5 minutos a 340 nm. Os resultados foram expressos em NADPH oxidado . min<sup>-1</sup> . mg de proteína<sup>-1</sup>.

A avaliação da atividade da enzima glutatona S-transferase (GST) foi realizada por meio da metodologia de Keen & Jakoby (1976). A atividade dessa enzima foi mensurada durante 5 minutos, em intervalos de 30 segundos, avaliando-se o aumento da absorbância devido a formação de um tioéter, a uma absorbância de 340nm. A composição de reação é tampão fosfato de potássio pH 6,5, GSH 1,5MM, CDNB 2mM em 1mL de etanol. A atividade da GST é expressa em μmoles de tioéter . min<sup>-1</sup> . mg de proteína<sup>-1</sup>.

#### 2.4.3 Distúrbios celulares

A mensuração da peroxidação lipídica foi avaliada por meio do produto da reação de ácido tiobarbitúrico com o malondialdeído, sendo mensurado em espectrofotômetro a 535 nm e expresso em nmol de MDA.mg<sup>-1</sup> de proteína (Buege and Aust, 1975).

A avaliação do efeito neurotóxico foi realizado pela análise da atividade das enzimas colinesterase (ChE), sendo mensurada por meio do método de Ellman (Ellman *et al.*, 1961) adaptado para microplaca por Herbert *et al.*, (1995). A Acetilcolina (ATC) foi utilizada como substrato e o ácido 5,5'-ditil-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB) como reagente de cor. A leitura de absorbância foi realizada em espectrofotômetro, a um comprimento de onda de 405 nm, sendo realizadas 4 leituras durante 3 minutos. Sua atividade foi expressa por nmol de acetiltiocolina hidrolisada . min<sup>-1</sup> . mg de proteína<sup>-1</sup>.

#### 2.5 Análises estatísticas

Os dados das variáveis abióticas foram avaliados por meio de estatísticas descritivas e comparadas aos valores de referência definidos para o cultivo de *Rhamdia quelen* (Amaral et al., 2015; Galdino, 2009; Gomes et al., 2000a; Graeff et al., 2008).

As frequências de ovos e larvas vivas ao longo do período experimental (12, 24, 48 e 72h), aqui definidas como viabilidade (%), foram comparadas por meio do teste de Qui Quadrado para Independência ( $\alpha=0,05$ ). Os dados relativos as áreas das larvas foram analisadas por meio da Análise de Variância Fator duplo, seguido do teste NHSD-Tukey.

Uma vez que as variáveis referentes às análises bioquímicas de detoxificação, efeito neurotóxico, metabolismo energético, atividade do sistema antioxidante e lipoperoxidação foram obtidas a partir de um delineamento inteiramente casualizado, assumiu-se o padrão de distribuição Gaussiana e a homocedasticidade das variâncias em cada condição analisada. Sendo assim, as variáveis foram analisadas por meio da Análise da Variância Fator-Duplo, assumindo como fatores fixos os Riachos e o Tempo de Desenvolvimento. Em situações de significância estatística ( $p < 0,05$ ), foi realizado o teste de acompanhamento de LSD-Fisher. Todas as análises realizadas assumiram um nível de significância de 0,05, sendo realizadas com auxílio dos pacotes *ExpDes.pt* e *ggplot2* do programa R (R Core Team, 2019).

### 3. Resultados

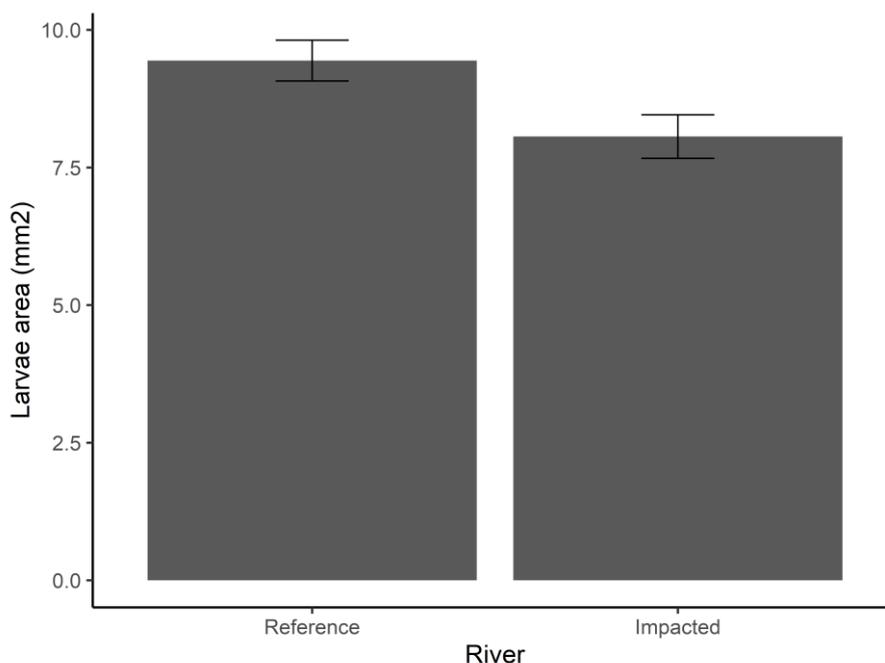
Segundo os resultados obtidos em relação às variáveis abióticas, foi observado que todas elas se encontram dentro dos padrões indicados como ideais para cultivo de *Rhamdia quelen* em tanques de piscicultura (Tabela 1).

Tab. 1 – Médias das variáveis abióticas avaliadas ao longo das 72 horas de experimentação, e valores de referência para cultivo de *Rhamdia quelen*.

		12h	24h	48h	72h	Referência para cultivo
Temperatura (°C)	Manoel Gomes	26,63	25,90	25,53	25,50	24 a 32°C
	Tormenta	26,20	25,77	25,83	25,50	
pH	Manoel Gomes	7,53	7,07	7,37	7,48	$4 \leq x \leq 8,5$
	Tormenta	7,24	7,15	7,02	7,30	
Amônia (mg.L <sup>-1</sup> )	Manoel Gomes	0,00	2,50	2,00	3,90	> 0,1
	Tormenta	0,10	0,30	1,80	2,40	
OD (mg.L <sup>-1</sup> )	Manoel Gomes	7,23	7,77	7,47	6,90	> 5,00
	Tormenta	7,27	7,37	7,00	7,03	
Nitrito (mg.L <sup>-1</sup> )	Manoel Gomes	0,04	0,05	0,03	0,04	$0,5 < x < 1,0$
	Tormenta	0,12	0,08	0,05	0,08	
Nitrato (mg.L <sup>-1</sup> )	Manoel Gomes	1,30	0,8	1,30	1,20	< 2,00
	Tormenta	1,90	1,1	1,80	1,70	
Amônia Tóxica (mg.L <sup>-1</sup> )	Manoel Gomes	0,00	0,03	0,04	0,09	< 0,1
	Tormenta	0,002	0,004	0,02	0,04	

\*Fonte: Temperatura - (Andrews et al., 1972; Chippari-gomes and Gomes, 1999)/ ph - (Alabaster and Lloyd, 1980; Boyd and Lichtkoppler, 1979; conama, 2005; Reis and Mendonça, 2009; Summerfelt, 1990) / oxigênio dissolvido - (Gomes et al., 2000b)/ nitrito - (Amaral et al., 2015) / nitrato - (Graeff et al., 2008)/ amônia tóxica - (Graeff et al., 2008)

Os animais apresentaram sobrevivência semelhantes, sendo que o percentual de indivíduos vivos permaneceu similar ao longo do tempo entre os grupos em desenvolvimento nas águas dos dois rios ( $\chi^2=0,0049$ ;  $p=0,999$ ). Contudo, foram verificadas as áreas totais das larvas entre os horários, comparando-as entre os riachos, sendo verificadas diferenças estatísticas significativas entre os riachos ( $F_2=26,30$ ;  $p<0,0001$ ) e entre os tempos de desenvolvimento ( $F_2=119,43$ ;  $p<0,0001$ ). Em média, foi verificado ao longo de todo o período que as larvas em desenvolvimento nas águas do riacho Tormenta foram significativamente menores ( $8,06\pm 0,40$  mm<sup>2</sup>) do que as áreas das larvas em desenvolvimento nas águas do riacho Manoel Gomes ( $9,44\pm 0,37$  mm<sup>2</sup>, Fig. 2).



**Figura 2.** Área das larvas em desenvolvimento nas águas dos riachos Manoel Gomes (REF) e Tormenta (IMP).

### 3.1 Metabolismo energético

**Hexoquinase (HK):** houve diferenças significativas entre os horários ( $F=38,32$ ;  $p<0,0001$ ), e na interação entre rios e horários ( $F=10,3$ ;  $p<0,00005$ ). Em 12 horas a atividade da HK entre os indivíduos em desenvolvimento nas águas do Rio Tormenta, considerado como local impactado (IMP), foi significativamente mais elevada que a observada entre os indivíduos do Rio Manoel Gomes, local referência (REF) ( $p<0,05$ ). Em 24 horas, não foram observadas diferenças significativas ( $F=2,6$ ;  $p>0,05$ ), mas em 48 e 72 horas houve uma redução das atividades enzimáticas, porém mais acentuada em IMP quando comparado a REF ( $F=6,55$ ,  $p<0,05$ ;  $F=11,84$ ,  $p<0,05$ , respectivamente, fig. 3A).

**Fosfofrutoquinase (PFK):** Foram observadas diferenças estatísticas entre os rios ( $F=42,01$ ,  $p<0,0001$ ), entre os horários ( $F=188,74$ ,  $p<0,0001$ ) e na interação dos rios e horários ( $F=25,03$ ,  $p<0,0001$ ). Em 12 h e 24 h foi observado que os valores do local IMP se apresentaram significativamente maiores que o rio REF ( $F=88,13$ ,  $p<0,0001$ ;  $F=27,53$ ,  $p<0,0001$ , respectivamente). Nos demais horários não houve diferenças significativas entre os rios ( $p>0,05$ ), porém foi observado a queda das atividades enzimáticas nos dois locais (fig. 3B).

**Citrato Sintase (CS):** apresentou diferenças entre os rios ( $F=9,98$ ,  $p<0,05$ ), entre os horários ( $F=33,91$ ,  $p<0,0001$ ) e entre os rios e horários ( $F=3,31$ ,  $p<0,05$ ), sendo que, em 24h, a atividade enzimática do rio IMP se apresentou reduzida quando comparada com o rio REF ( $F=17,15$ ,  $p<0,0001$ , fig. 3C).

**Lactato desidrogenase (LDH):** foi possível observar diferenças significativas entre os rios ( $F=17,657$ ,  $p<0,0001$ ), entre os horários ( $F=37,99$ ,  $p<0,0001$ ) e na interação dos rios e horários ( $F=55,05$ ,  $p<0,0001$ ). Em 12h de desenvolvimento a atividade enzimática dos indivíduos do local IMP apresentaram-se elevadas em relação ao local REF ( $F=164,43$ ,  $p<0,0001$ ), com posterior redução em 72h ( $F=17,78$ ,  $p<0,0001$ , fig. 3D).

**Malato Desidrogenase (MDH):** indicou diferenças estatísticas em relação aos horários ( $F=6,67$ ,  $p<0,05$ ), entre os rios ( $F=45,314$ ,  $p<0,0001$ ), e na interação entre rios e horários ( $F=11,68$ ,  $p<0,0001$ ). Em 48h foi observado que no local IMP as médias estavam reduzidas em relação ao local REF ( $F=39,95$ ,  $p<0,00001$ , fig. 3E).

### 3.2 Sistema antioxidante

**Catalase (CAT):** foram obtidas diferenças entre horários ( $F=64,419$ ,  $p<0,0001$ ) e na interação dos rios e os horários ( $F=8,44$ ,  $p<0,0001$ ). Em 48h o rio IMP apresentou médias significativamente menores do que o rio REF ( $F=11,97$ ,  $p<0,05$ ). Em 72h houve uma inversão, sendo que no rio IMP houve uma elevação significativa das médias em relação ao REF ( $F=12,55$ ,  $p<0,05$ , fig. 4A).

**Glutationa Peroxidase (GPx):** apresentou diferenças estatísticas em relação aos rios ( $F=7,65$ ,  $p<0,05$ ), entre os horários ( $F=24,17$ ,  $p<0,0001$ ) e na interação dos rios e horários ( $F=33,56$ ,  $p<0,0001$ ). Em 12h, os indivíduos em desenvolvimento em IMP apresentaram atividade aumentada em relação ao REF ( $F=27,24$ ,  $p<0,0001$ ), havendo uma inversão dos valores médios em 24h ( $F=9,62$ ,  $p<0,05$ ), e em 48h ( $F=70,87$ ,  $p<0,0001$ , fig. 4B).

**Glutationa Redutase (GR):** esta enzima indicou diferenças significativas apenas em relação aos horários ( $F=77,08$ ,  $p<0,0001$ ), sendo que entre os rios as médias foram

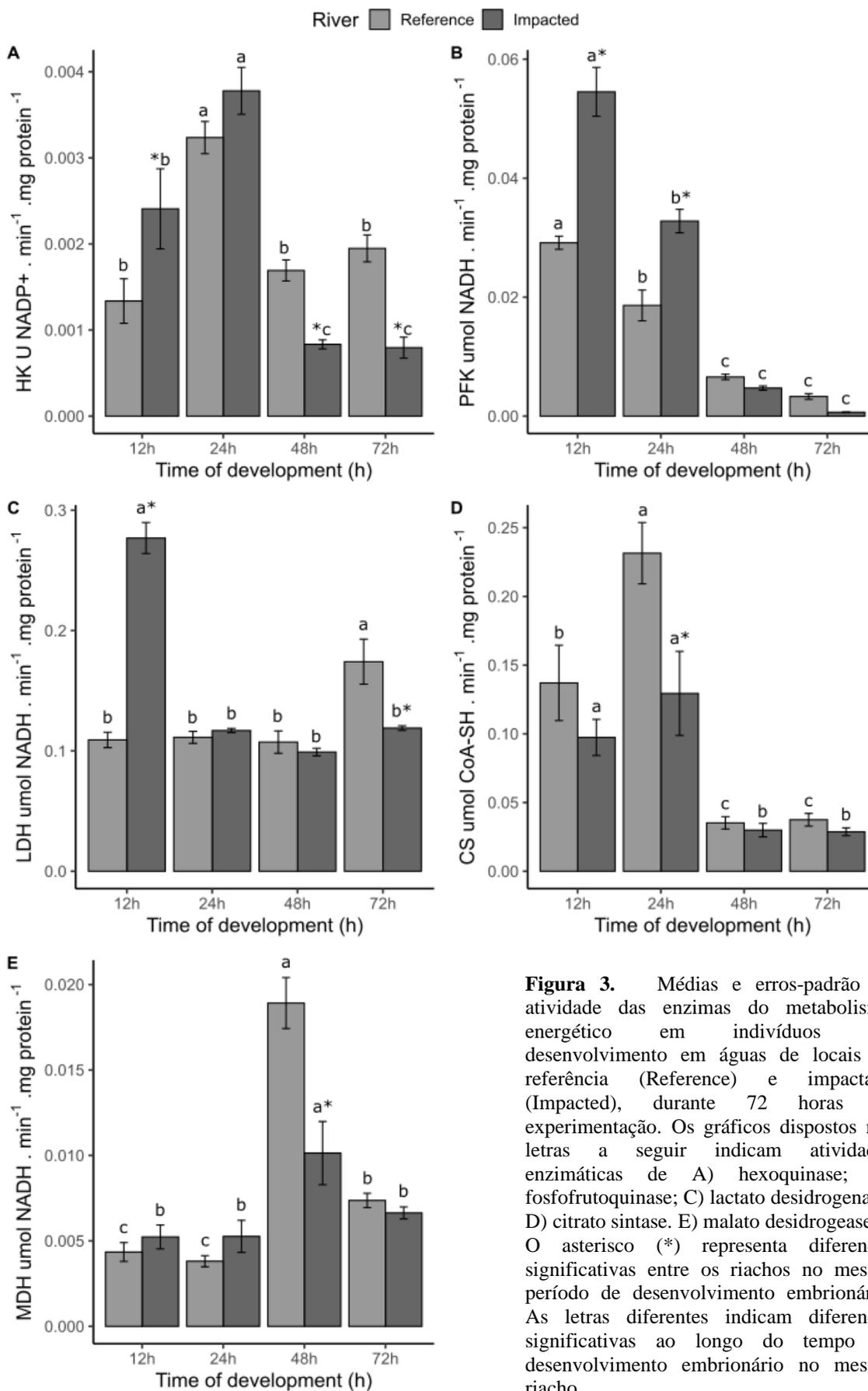
consideradas iguais ( $F=2,29$ ,  $p=0,13$ ). Porém, é importante ressaltar que a medida que o tempo de desenvolvimento foi avançando, as médias da atividade foram decrescendo gradativamente, até que em 72h as médias estão próximas a zero (fig. 4C).

**Glutathione transferase (GST):** houve diferenças significativas em relação aos horários ( $F= 29,61$ ;  $p<0,0001$ ) e na interação dos horários e rios ( $F= 15,67$ ,  $p<0,0001$ ). Em 12, 24 e 72 horas, a atividade da GST entre os indivíduos do riacho IMP foi significativamente mais elevada que a observada entre os indivíduos em desenvolvimento nas águas do local REF ( $p<0,05$ ). Em 48h de desenvolvimento, os indivíduos do local IMP apresentaram médias significativas menores em relação a REF ( $p<0,05$ ; fig. 4D).

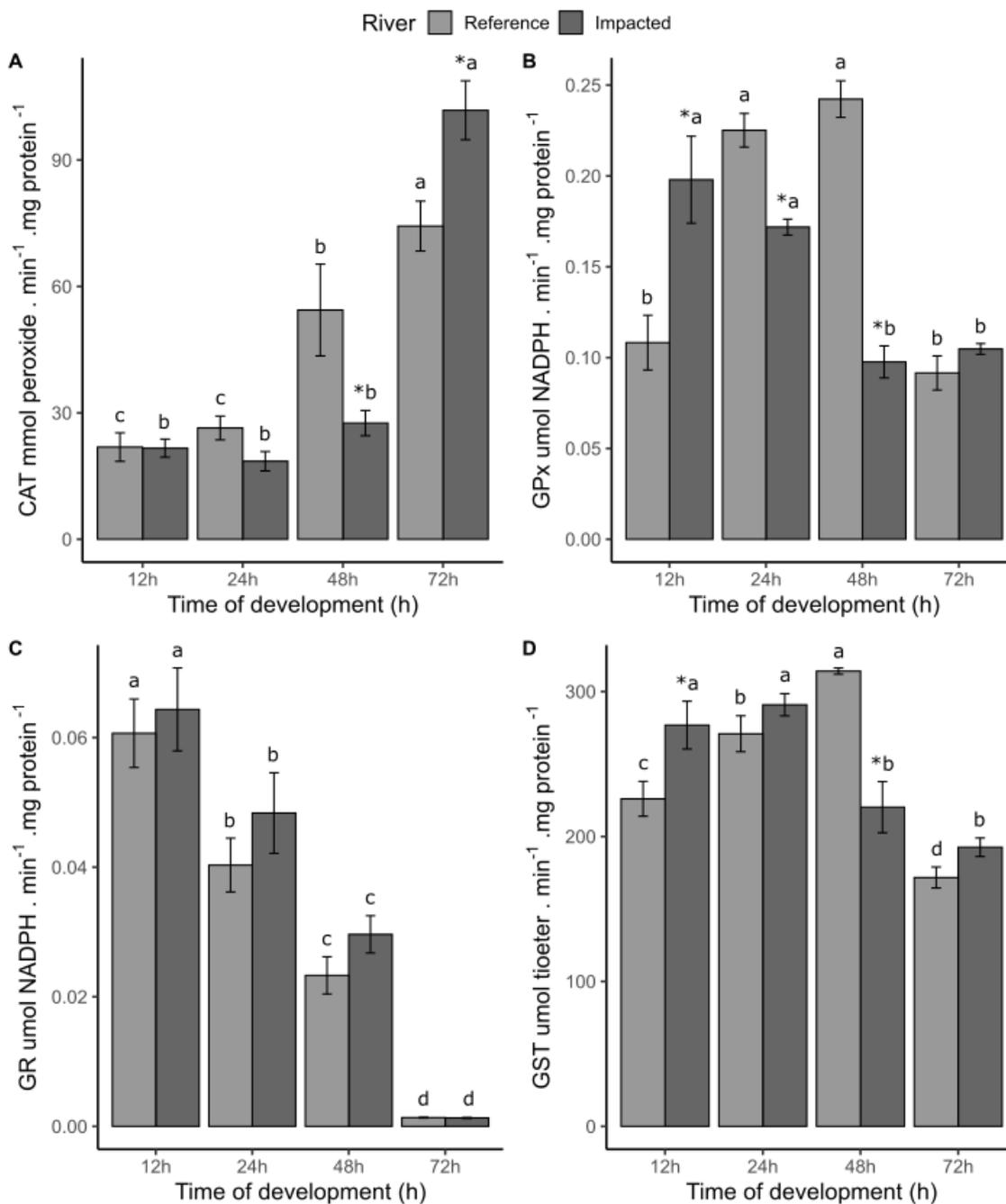
### 3.3 Distúrbios detectados

**Lipoperoxidação (LPO):** houve diferenças significativas em relação aos rios ( $F=19,20$ ,  $p<0,0001$ ) e em relação aos horários ( $F=25,58$ ,  $p<0,0001$ ), sendo observado maiores médias em IMP quando comparado a REF (fig. 5A).

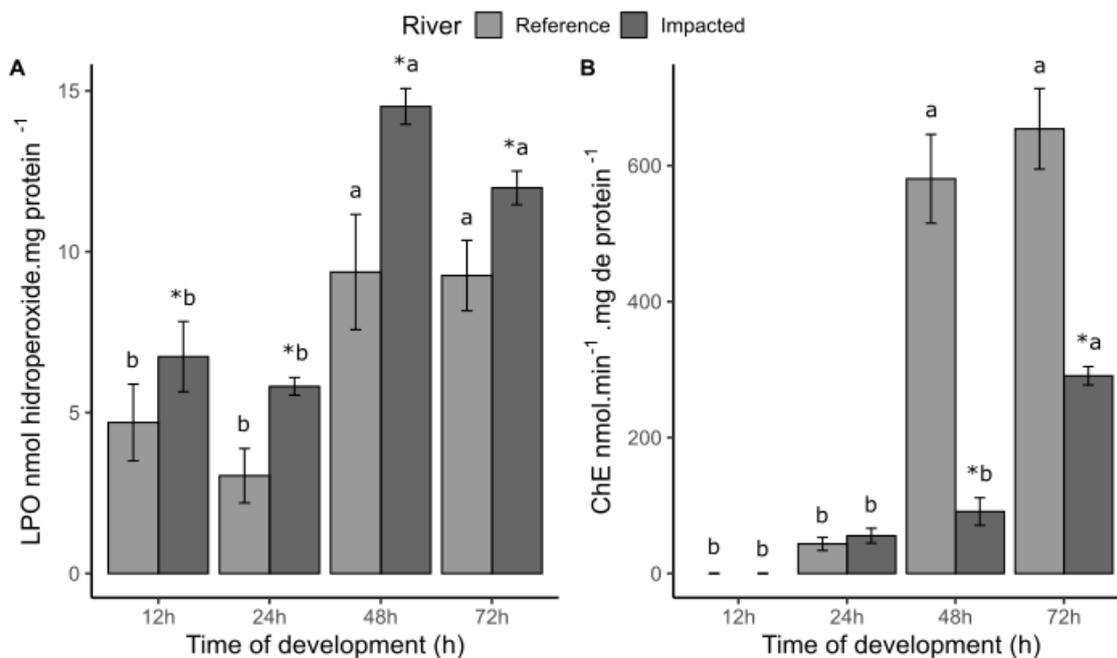
**Atividade da enzima colinesterase:** houve diferenças significativas entre os rios ( $F= 82,260$ ;  $p<0,0001$ ), entre os horários ( $F= 95,9$ ;  $p<0,0001$ ) e na interação de rios e horários ( $F= 30,2$ ;  $p<0,0001$ ). Em 48h foram observados menores valores da atividade enzimática do local IMP em relação ao REF ( $F=111,49$ ;  $p<0,0001$ ), sendo que tal inibição se manteve em 72h ( $F=61,43$ ;  $p<0,0001$ ; fig. 5B).



**Figura 3.** Médias e erros-padrão da atividade das enzimas do metabolismo energético em indivíduos em desenvolvimento em águas de locais de referência (Reference) e impactado (Impacted), durante 72 horas de experimentação. Os gráficos dispostos nas letras a seguir indicam atividades enzimáticas de A) hexoquinase; B) fosfofrutoquinase; C) lactato desidrogenase; D) citrato sintase. E) malato desidrogenase. O asterisco (\*) representa diferenças significativas entre os riachos no mesmo período de desenvolvimento embrionário. As letras diferentes indicam diferenças significativas ao longo do tempo de desenvolvimento embrionário no mesmo riacho.



**Figura 4.** Médias e erros-padrão das atividades das enzimas do sistema antioxidante em indivíduos em desenvolvimento em águas de local referência (Reference) e impactado (Impacted), durante 72 horas de experimentação. A) catalase; B) glutathione peroxidase; C) glutathione reductase; D) glutathione S-transferase. O asterisco (\*) representa diferenças significativas entre os riachos no mesmo período de desenvolvimento embrionário. As letras diferentes indicam diferenças significativas ao longo do tempo de desenvolvimento embrionário no mesmo riacho.



**Figura 5.** Médias e erros-padrão em indivíduos em desenvolvimento em águas de local referência (Reference) e impactado (Impacted), durante 72 horas de experimentação. A) lipoperoxidação; B) atividade da enzima colinesterase. O asterisco (\*) representa diferenças significativas entre os riachos no mesmo período de desenvolvimento embrionário. As letras diferentes indicam diferenças significativas ao longo do tempo de desenvolvimento embrionário no mesmo riacho.

#### 4 Discussão

A análise dos animais que se desenvolveram em águas do rio Manoel Gomes, considerado com rio de referência (REF), foi observado variação da modulação enzimática em relação às fases de desenvolvimento. Foi verificada a indução do metabolismo aeróbico nas primeiras 24 horas, a qual foi representada por aumento na atividade da HK e CS, e redução drástica da atividade das enzimas da via glicolítica e ciclo de Krebs em 48 e 72 horas (HK, PFK e CS). Esta mudança de comportamento enzimático parece estar relacionada com uma economia de energia durante eventos marcantes como a eclosão, abertura da boca e opérculo, início da natação e a rápida redução do saco vitelínico. Por este motivo, a discussão dos resultados será abordada sobre as alterações metabólicas e fisiológicas observadas entre os indivíduos em desenvolvimento nas águas do rio Tormenta, considerado como impactado, dando ênfase em duas etapas: no período entre fertilização e organogênese (12h e 24h), e durante a morfogênese (48h e 72h).

#### 4.1 Efeitos entre as fases de fertilização a organogênese

No riacho Tormenta, definido como impactado (IMP), observamos em 12h e 24h a indução das enzimas HK e PFK quando comparadas com o riacho Manoel Gomes (REF). Estas duas enzimas fazem parte da via glicolítica, sendo que a HK converte glicose em glicose-6-fosfato, e a PFK forma frutose-1,6-bifosfato a partir de frutose-1-fosfato (Kuettner et al., 2010). O presente achado sugere, portanto, uma alteração no desenvolvimento metabólico dos animais em IMP, uma vez que em 24 horas se esperava uma maior atividade no Ciclo de Krebs, como observado em REF. O aumento da atividade das enzimas HK e PFK, acompanhadas pela redução da atividade da CS, pode estar relacionado a efeitos negativos dos contaminantes presentes na água de IMP. Possivelmente, a indução da LDH observada nas primeiras 12 horas pode estar relacionada a busca de via alternativa para manutenção da produção de ATP, o que indica que pode ter ocorrido distúrbios na produção de energia destes animais. É provável que esse aumento na demanda energética esteja relacionado a ajustes fisiológicos relativos à pior qualidade ambiental observada no riacho Tormenta.

O atraso no desenvolvimento metabólico em IMP também foi constatado pelo aumento da atividade da LDH em 12h, quando se esperava valores reduzidos conforme observado em REF. A principal função da LDH é regenerar NAD<sup>+</sup> e reduzir a concentração de piruvato, para manutenção da via glicolítica em baixa concentração de oxigênio (Nelson et al., 2015). A indução da LDH pode ser resposta para qualificar situações ambientais estressantes, como por exemplo, situações de baixa disponibilidade de oxigênio (Zakhartsev et al., 2004). Nossos achados são corroborados por estes fatos, sugerindo que a alocação dos ovos nas águas IMP promoveu um aumento da demanda energética, induzindo a via anaeróbica, possibilitando regulações fisiológicas devido a exposição a uma água de pior qualidade. Em trabalho de Nimet *et al.* (2017), sedimentos deste mesmo riacho foram avaliados, sendo encontrados 6,32 ppb de organofosforados, e um valor médio de pH equivalente a 6,8 em suas águas.

Os marcadores utilizados para acompanhamento da defesa antioxidante foram CAT, GPx, GR e LPO. Entre os animais do grupo IMP em 24 h, observou-se redução da atividade da GPx quando comparado a REF, sugerindo a depleção de GSH em função de seu uso pela GST, em um processo de detoxificação de xenobióticos. A indução da atividade de GSTs acompanhado pela inibição de GPx também foi observada em *Brycon cephalus* expostos a organofosforado. A utilização massiva da biotransformação de fase

II causa depleção nos níveis de GSH no sistema e a depleção desse importante substrato aumenta o risco de estresse oxidativo (Monteiro et al., 2006).

Enquanto a atividade de GPx está estimulada nas primeiras 24 horas de desenvolvimento, a atividade enzimática da catalase encontra-se reduzida nos dois riachos. Explicações plausíveis para este comportamento incluem a utilização da via GPx para degradação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, como também a baixa expressão da enzima nos períodos iniciais do desenvolvimento. Devido a não avaliação desses fatores, as suposições aqui apresentadas são especulativas.

Por meio do aumento da reação de lipoperoxidação dos indivíduos expostos a águas do IMP, podemos considerar que nas primeiras horas de exposição é possível propor a presença de danos celulares. O aumento de peroxidação lipídica potencializa alterações estruturais no DNA, devido ao aumento da permeabilidade da membrana (Vieira et al., 2017). Tal padrão foi também observado em *Alburnus mossulensis* expostos a baixas concentrações (1,25 ug/L) de fenpropatrina, ressaltando, dessa forma, a capacidade dos agrotóxicos em perturbar os parâmetros bioquímicos de defesa das células (Banaee et al., 2014).

#### 4.2 Efeitos na fase de morfogênese

A partir de 36h de desenvolvimento, os espécimes de *R. quelen* iniciam um período de adaptação fisiológica. Nesse momento, o embrião é chamado de larva, apresenta boca e opérculos abertos (Rodrigues-Galdino et al., 2009). Esse momento específico de abertura opercular torna o contato da larva com a água ainda mais intrínseco, podendo justificar a modulação de várias enzimas a partir deste estágio de desenvolvimento.

Durante a morfogênese sugerimos que os animais apresentaram equalização do metabolismo energético anaeróbico, não havendo necessidade da expressão de vias alternativas de produção de glicose. Porém, em 72h é evidenciada menor atividade de LDH nos indivíduos de IMP quando comparada a REF. Além da LDH ser uma enzima importante na identificação de risco ambiental, ela pode evidenciar o estado respiratório de animais aquáticos (Almeida et al., 2002).

Quanto ao sistema antioxidante, houve depleção da atividade de GR em ambos os grupos, o que promove a diminuição da disponibilidade de GSH. Quando esse substrato tem seus níveis reduzidos, a atividade de enzimas dependentes também se altera, como observado pela redução da atividade de GPx e GST, especialmente entre os animais do

grupo IMP. Sugere-se, portanto, que entre os peixes de IMP houve redução do potencial de defesa antioxidante da célula, especialmente pela possível redução de GSH. Em contraponto, a redução de atividade da GR e GPx, durante a morfogênese houve aumento da atividade de CAT, possivelmente justificado pela função similar a GPx de oxidar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub>. Contudo, ressalta-se que este também pode ser um resultado similar ao encontrado em *Brycon cephalus* exposto a concentração subletal de metilparation (organofosforado), que também apresentou diminuição da GPx e aumento da atividade da catalase (Monteiro *et al.*, 2006).

A entrada de compostos xenobióticos em rios por meio da lixiviação de moléculas químicas presentes nos solos, causa ativação de enzimas com função de detoxificação, como as GSTs. As GSTs fazem parte de uma família de enzimas que catalisa a conjugação da glutationa reduzida a uma ampla gama de substratos, garantindo a formação de compostos polares que são mais facilmente excretados (Mannervik E Jemth, 2001). Em 48h a atividade de GST aparecem inibidas em IMP, possivelmente em consequência da depleção de GSH, conforme descrito anteriormente. Novamente, sugerimos que a abertura opercular faz com que o contato do animal com a água seja ainda mais intenso, aumentando assim a ação de agentes estressores presentes na água, os quais podem causar uma elevação na concentração das EROs, reduzindo ainda mais o potencial antioxidante na célula.

Como consequência da redução da atividade do sistema antioxidante, foi observado um intenso aumento da reação de lipoperoxidação, sendo, portanto, um indicativo da instalação de estresse oxidativo e de danos celulares. Locais contaminados com xenobióticos podem induzir ao aumento dessas reações, conforme já descrito por Ferreira *et al.*, (2010) em *Rhamdia quelen* exposto a metilparation, glifosato e tebuconazole. Além de pesticidas, também foi verificado o aumento de peroxidação lipídica em *R. quelen* exposta ao metal pesado cádmio (Pretto *et al.*, 2010).

Após 48h da fecundação, a expressão gênica de ChE tornou-se mais efetiva entre os animais de ambos os grupos. Contudo, ao comparar a atividade enzimática de ChE em IMP em relação a REF, observa-se a inibição de sua atividade. Tal fato parece confirmar a presença de agrotóxicos organofosforados, conforme relatado por Nimet *et al.* (2017), sendo que tais produtos têm a capacidade de inibir a atividade de colinesterases (Quinn, 1987). A inibição das enzimas acetilcolinesterases tem efeito direto na motilidade, devido ao acúmulo por mais tempo das colinas nas fendas sinápticas nos músculos, fato que reduz a capacidade predadora e de fuga do animal, esse mesmo efeito inibitório parece explicar

o tamanho reduzido dos animais do rio IMP, por reduzir a capacidade de desempenho de suas funções biológicas como alimentação. Em contrapartida, outras enzimas da família das colinesterases conhecidas como butirilcolinesterases tem função detoxificante e eventualmente também pode ter função análoga as acetilcolinesterases, uma vez inibida contribui para diminuir o poder detoxificante da célula, o que parece reforçar os resultados da morfometria dos animais. Peixes *Colossoma macropomum* expostos ao organofosforado triclorfon, utilizado contra infecções de parasitas acatocéfalos, causam a diminuição da atividade de AChE (Duncan et al., 2019), assim como em *R. quelen* exposta a cádmio (Preto et al., 2010). A atividade de enzima AChE foi mensurada no cérebro e músculos de peixes (*Corydoras paleatus*) expostos ao carbamato conhecido como carbaril, os resultados demonstraram que as atividades de cérebro e musculo foram reduzidas, porém o fator primordial que leva a mortalidade foi a inibição da Ache muscular (Guiloski et al, 2010).

A partir do exposto, considera-se que o principal achado deste estudo foi a alteração fisiológica de ovos e larvas de *Rhamdia quelen* em desenvolvimento em águas do riacho Tormenta (IMP), cujo uso e ocupação do solo de sua bacia, eminentemente agrícola, se diferencia do rio Manoel Gomes (REF), cuja ocupação se caracteriza por um local de ampla preservação ambiental ao se encontrar dentro de uma Unidade de Conservação (Parque Nacional do Iguaçu).

Afora tal resultado, ressalta-se a significativa alteração da fisiologia dos animais a partir de 36 horas de desenvolvimento, havendo o início da abertura opercular e, portanto, maior contato com o meio externo. Desta forma, os animais em desenvolvimento em águas do riacho Tormenta passam a se expor ainda mais aos xenobióticos, e, portanto, exacerba-se os efeitos deletérios nos organismos. Sendo assim, afirma-se o impacto causado nos estágios iniciais de desenvolvimento de *R. quelen*, promovido pela exposição a águas oriundas de riachos, cujas microbacias têm o uso do solo essencialmente voltado a agricultura. Tal fato é um alerta a garantia de *fitness* de espécies nativas desta região, constantemente expostas a essa situação de impacto.

## 5. Conclusão

As águas de riachos localizados em microbacias com uso e ocupação do solo voltado a agricultura podem promover efeitos deletérios em organismos não-alvos, como os peixes. Os testes indicaram que águas provenientes de riachos, cujas bacias são eminentemente agrícolas, induzem o estresse oxidativo, perturbam as etapas de produção

de energia, causam danos fisiológicos e alteram a atividade de enzimas colinesterases. Esses efeitos podem estar associados ao risco de alterações no estado de saúde de animais, como perda da mobilidade, diminuição do tamanho corporal e enfim, efeito indireto sobre a dinâmica das comunidades biológicas. Locais predominantemente agrícolas, além causar efeitos negativos no meio ambiente podem afetar a saúde humana, já que os peixes frequentemente fazem parte da dieta alimentar. Tais fatos, reafirmam a necessidade de estudos constantes de qualidade ambiental, assim como fiscalização e instrução em relação a forma de uso de agroquímicos e sua eliminação.

### Referências

- Aebi, H., 1984. Oxygen Radicals in Biological Systems. *Methods Enzymol.* 105, 121–126.
- Alabaster, J.S., Lloyd, R., 1980. Water quality criteria for European freshwater fish. European Inland Fisheries Advisory Commission Report (FAO).
- Almeida, J.A., Diniz, Y.S., Marques, S.F.G., Faine, L.A., Ribas, B.O., Burneiko, R.C., Novelli, E.L.B., 2002. The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. *Environ. Int.* 27, 673–679. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(01\)00127-1](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(01)00127-1)
- Amaral, H.J., Garcia, S., Warmling, P.F., Silva, B.C. da, Marchiori, N. da C., 2015. Assim cultivamos o Jundiá *Rhamdia quelen* no estado de Santa Catarina.
- Andrews, J.W., Knight, L.H., Murai, T., 1972. Temperature Requirements for High Density Rearing of Channel Catfish from Fingerling to Market Size. *Progress. Fish-Culturist* 34, 240–241. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1972\)34](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1972)34)
- Baldwin, J., Elias, J.P., Wells, R.M.G., Donovan, D.A., 2007. Energy metabolism in the tropical abalone, *Haliotis asinina* Linné: Comparisons with temperate abalone species. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 342, 213–225. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2006.09.005>
- Banaee, M., Sureda, A., Zohiery, F., Hagi, B.N., Garanzini, D.S., 2014. Alterations in biochemical parameters of the freshwater fish, *Alburnus mossulensis*, exposed to sub-lethal concentrations of Fenprothrin. *Int. J. Aquat. Biol.* 2, 58–68.
- Boulekbache, H., 1981. Energy metabolism in fish development. *Integr. Comp. Biol.* 21, 377–389. <https://doi.org/10.1093/icb/21.2.377>
- Boyd, C.E., Lichtkoppler, F., 1979. Water Quality Management in pond fish culture Research and Development Series. *Int. Cent. Aquac.* 22, 1–30.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*

72, 248–254.

Buege, J.A., Aust, S.D., 1975. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 129, 302–310.

Burigo, A., Venâncio, J., 2016. Impacto dos Agrotóxicos na alimentação , saúde e meio ambiente. *Laboratório Herbet de Souza* 94.

Carneiro, F.F., Asher, G., Sassone-Corsi, P., Domínguez, R., Maté-Muñoz, J.L., Cuenca, E., García-Fernández, P., Mata-Ordoñez, F., Lozano-Estevan, M.C., Veiga-Herreros, P., da Silva, S.F., Garnacho-Castaño, M.V., Passanha, A., Benício, M.H.D.A., Venâncio, S.I.S.I., Dos Reis, M.C.G., Desbrow, B., Burd, N.A., Tarnopolsky, M., Moore, D.R., Guest, N., Corey, P., Vescovi, J., El-Sohemy, A., Van Itallie, T.B., Sinisterra, L., Stare, F.J., Wylie, L.J., Bailey, S.J., Kelly, J., Blackwell, J.R., Vanhatalo, A., Jones, A.M., Passanha, A., Benício, M.H.D.A., Venâncio, S.I.S.I., Khan, M.J., Gerasimidis, K., Edwards, C.A., Shaikh, M.G., Forsythe, L.K., Wallace, J.M.W., Livingstone, M.B.E., Rigotto, raquel maria, Augusto, lia giraldo da silva, Friedrich, K., Francisco, A.R.L., Kligerman, J., Brasil. Ministério da Saúde, 2015. Dos Agrotóxicos Na Saúde, *Nutrition Research Reviews*. <https://doi.org/10.1017/S0954422408138732>

Childress, J.J., Somero, G.N., 1979. Depth-related enzymic activities in muscle, brain and heart of deep-living pelagic marine teleosts. *Mar. Biol.* 52, 273–283. <https://doi.org/10.1007/BF00398141>

Chippari-gomes, A.R., Gomes, L.C., 1999. Lethal Temperatures for Silver Catfish , *Rhamdia quelen* , Fingerlings. *J. Appl. Aquac.* 9, 11–21.

conama, 2005. Resolução 357.

Duncan, W.P., Idalino, J.J.S., da Silva, A.G., Moda, R.F., da Silva, H.C.M., Matoso, D.A., Gomes, A.L.S., 2019. Acute toxicity of the pesticide trichlorfon and inhibition of acetylcholinesterase in *Colossoma macropomum* (Characiformes: Serrasalminidae). *Aquac. Int.* <https://doi.org/10.1007/s10499-019-00497-w>

Eder, K.J., Köhler, H.R., Werner, I., 2007. Pesticide and pathogen: Heat shock protein expression and acetylcholinesterase inhibition in juvenile Chinook salmon in response to multiple stressors. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 1233–1242. <https://doi.org/10.1897/05-462R2.1>

ELLMAN, G.L., COURTNEY, K.D., ANDRES, V., FEATHER-STONE, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95.

Ferreira, D., Motta, A.C. da, Kreutz, L.C., Toni, C., Loro, V.L., Barcellos, L.J.G., 2010. Assessment of oxidative stress in *Rhamdia quelen* exposed to agrichemicals. *Chemosphere* 79, 914–921.

Flohé, L., Günzler, W.A., 1984. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 105, 114–21.

- Galdino, A.M.R., 2009. Estadiamento dos embriões e larvas e avaliação da qualidade das larvas e pós larvas do peixe neotropical jundiá *Rhamdia quelen* (Siruliformes, Heptapteridae) produzidas sob diferentes temperaturas de incubação.
- Guiloski, I. C., Silva, E.G., Nishikawa, C.M., Assis, H.C.S. 2010. Atividade da colinesterases em cérebro e músculo de *Corydoras paleatus* (Pisces, Teleostei) expostos ao carbaril. *Ciência Agrária Ambiental* 8, 461-468.
- Gomes, L. de C., Golombieski, J.I., Gomes, A.R.C., Baldisserotto, B., 2000a. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). *Ciência Rural* 30, 179–185. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782000000100029>
- Gomes, L. de C., Golombieski, J.I., Gomes, A.R.C., Baldisserotto, B., 2000b. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). *Ciência Rural* 30, 179–185. <https://doi.org/10.1590/s0103-84782000000100029>
- Graeff, A., Pruner, E.N., Junior, H.A., 2008. Produção de alevinos de Jundiá ( *Rhamdia quelen* ).
- Grivennikova, V.G., Vinogradov, A.D., 2006. Generation of superoxide by the mitochondrial Complex I. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1757, 553–561.
- Herbert, A., Guilhermino, L., Assis, H.C.S. de, Hansen, P.D., 1995. Acetylcholinesterase activity in aquatic organisms as pollution biomarker. *Angew Zool.* 3, 1–5.
- Keen, H., Jakoby, B., 1976. Mechanism for the Several Activities of the Glutathione 251.
- Kuettner, E.B., Kettner, K., Keim, A., Svergun, D.I., Volke, D., Singer, D., Hoffmann, R., Müller, E.C., Otto, A., Kriegel, T.M., Sträter, N., 2010. Crystal structure of hexokinase KIHxk1 of *Kluyveromyces lactis*: A molecular basis for understanding the control of yeast hexokinase functions via covalent modification and oligomerization. *J. Biol. Chem.* 285, 41019–41033. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.185850>
- Mannervik, B., Jemth, P., 2001. Measurement of glutathione transferases. *Curr Protoc Toxicol* 6, 6–10.
- Monteiro, D.A., de Almeida, J.A., Rantin, F.T., Kalinin, A.L., 2006. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 143, 141–149.
- Nelson, D.L., Lehninger, A.L., Cox, M.M., 2015. *Princípios de bioquímica*, 6a ed. Ediciones Omega.
- Nimet, J., Guimarães, A. T. B., Delariva, R. L., 2017. Use of Muscular Cholinesterase of *Astyanax bifasciatus* (Teleostei, Characidae) as a Biomarker in Biomonitoring of Rural Streams. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 99, 232–

238.

- Pereira, C.R., Barcellos, L.J.G., Kreutz, L.C., Quevedo, R.M., Ritter, F., Silva, L.B., 2006. Embryonic and larval development of Jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard, 1824, Pisces, Teleostei), a South American Catfish. *Brazilian J. Biol.* 66, 1057–1063.
- Pretto, A., Loro, V.L., Morsch, V.M., Moraes, B.S., Menezes, C., Clasen, B., Hoehne, L., Dressler, V., 2010. Acetylcholinesterase activity, lipid peroxidation, and bioaccumulation in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to cadmium. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 58, 1008–1014. <https://doi.org/10.1007/s00244-009-9419-3>
- Quinn, D.M., 1987. Acetylcholinesterase: Enzyme Structure, Reaction Dynamics, and Virtual Transition States. *Chem. Rev.* 87, 955–979. <https://doi.org/10.1021/cr00081a005>
- Rebelo, R.M., Vasconcelos, R.A., Buys, B.D.M.C., Rezende, J.A., Moraes, K. de O.C. de, Oliveira, R. de P., 2010. Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: uma abordagem ambiental. Brasília.
- Reis, J.A.T. dos, Mendonça, A.S.F., 2009. Análise técnica dos novos padrões brasileiros para amônia em efluentes e corpos d'água. *Eng. Sanit. e Ambient.* 14, 353–362.
- Rodrigues-Galdino, A.M., Maiolino, C.V., Forgati, M., Donatti, L., Mikos, J.D., Carneiro, P.C.F., Rios, F.S.A., 2009. Development of the neotropical catfish *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) incubated in different temperature regimes. *Zygote* 18, 131–144.
- Saborowski, R., Buchholz, F., 2002. Metabolic properties of Northern krill, *Meganyctiphanes norvegica*, from different climatic zones. II. Enzyme characteristics and activities. *Mar. Biol.* 140, 557–565. <https://doi.org/10.1007/s00227-001-0734-0>
- Shepherd, D., Garland, P.B., 1969. The Kinetic Properties of Citrate Synthase from Rat Liver Mitochondria, *Biochem. J.*
- Sies, H., Koch, O.R., Martino, E., Boveris, A., 1979. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. *FEBS Lett.* 103, 287–90.
- Summerfelt, R.C., 1990. Water Quality Considerations for Aquaculture. *Dep. Anim. Ecol.* 50, 11–21.
- Thuesen, E. V., McCullough, K.D., Childress, J.J., 2005. Metabolic enzyme activities in swimming muscle of medusae: Is the scaling of glycolytic activity related to oxygen availability? *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom* 85, 603–611. <https://doi.org/10.1017/S0025315405011537>
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160, 1–40.

- Vieira, C.E.D., Costa, P.G., Cabrera, L.C., Primel, E.G., Fillmann, G., Bianchini, A., Bueno dos Reis Martinez, C., 2017. A comparative approach using biomarkers in feral and caged Neotropical fish: Implications for biomonitoring freshwater ecosystems in agricultural areas. *Sci. Total Environ.* 586, 598–609.
- Woynarovich, E., 1983. A propagação artificial de peixes de aguas tropicais : manual de extensão.
- Zakharov, M., Johansen, T., Portner, H.O., Blust, R., 2004. Effects of temperature acclimation on lactate dehydrogenase of cod (*Gadus morhua*): genetic, kinetic and thermodynamic aspects. *J. Exp. Biol.* 207, 95–112.

## **NORMAS DA REVISTA CHEMOSPHERE**

### **NEW SUBMISSION**

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or lay-out that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately. If you use the Your Paper Your Way service, please make sure that you also provide your highlights and the six suggested referees in this document.

### **References**

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

### **Formatting requirements**

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

### **Figures and tables embedded in text**

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file. The corresponding caption should be placed directly below the figure or table.

### **Peer review**

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. More information on types of peer review.

### **REVISED SUBMISSIONS**

#### **Use of word processing software**

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <https://www.elsevier.com/guidepublication>). See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor. For revised submissions: always include one copy of the new text with changes clearly indicated (in red or bold or track change) and one version with all changes accepted, and a letter with your response to the comments of the reviewers.

## Article structure

Please see our Important instructions for Authors submitting to The Science of Environmental Toxicology Section

### Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

### Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

### Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

### Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

### Results

Results should be clear and concise.

### Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

### Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

### Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

### Essential title page information

- Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- Author names and affiliations. Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.
- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

## Highlights

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: example Highlights.

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

## Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself (and then later again when used in the text, see Abbreviations).

## Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of  $531 \times 1328$  pixels (h  $\times$  w) or proportionally more. The image should be readable at a size of  $5 \times 13$  cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view Example Graphical Abstracts on our information site.

Authors can make use of Elsevier's Illustration Services to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

## Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

## Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

## Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

## Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUPAC: Nomenclature of Organic Chemistry: <http://www.iupac.org/> for further information.

## Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently

denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

#### Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

#### Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

#### Artwork

##### Electronic artwork

##### General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

A detailed guide on electronic artwork is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

##### Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

##### Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

### Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

### Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

### References

#### Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

#### Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

#### Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

#### References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

#### Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

#### Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof

stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

#### Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. Two authors: both authors' names and the year of publication;
3. Three or more authors: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown ...'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. *Mendeley Data*, v1. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.