



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013  
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

**TOXICIDADE SUBCRÔNICA DE DOIS FUNGICIDAS E SUA MISTURA NA ATIVIDADE DE ALGUMAS ENZIMAS DE PACU**

Eliane Alves de Oliveira<sup>1a</sup>; Claudio M. Jonsson<sup>1b</sup>; Zaira Clemente<sup>1c</sup>; Vera Lucia Castro<sup>1c</sup>

<sup>1</sup> Embrapa Meio ambiente

Nº 13421

**RESUMO** – Estudou-se o efeito sobre a atividade de enzimas hepáticas do metabolismo intermediário, de conjugação e antioxidantes, decorrente da exposição do peixe “pacu” (*Piaractus mesopotamicus*) por 14 dias aos fungicidas epoxiconazol, piraclostrobina e à mistura dos mesmos. As atividades da fosfatase ácida (Pac) e superóxido dismutase (SOD) foram aumentadas significativamente ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle nas exposições ao epoxiconazol na concentração de  $22,8 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Esta é equivalente a 1/100 da concentração letal média (CL50-96h) determinada em peixes. Com relação aos efeitos da piraclostrobina e à mistura epoxiconazol+piraclostrobina, não se observou decréscimo ou incremento das atividades das enzimas avaliadas. Atribuíram-se valores de 1,8 e  $2,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ , respectivamente para piraclostrobina e a mistura epoxiconazol+piraclostrobina, como concentrações de efeito não observado (CENO). O valor deste parâmetro para o epoxiconazol seria equivalente a  $2,28 \mu\text{g.L}^{-1}$ , já que observou-se efeito na concentração imediatamente superior a esta. Os dados são relevantes na identificação de possíveis biomarcadores e no direcionamento de políticas públicas quanto ao estabelecimento de níveis máximos de poluentes na água para a proteção da biota aquática.

**Palavras-chaves:** peixe, *Piaractus mesopotamicus*, toxicidade, fungicida, enzima, agrotóxico

<sup>a</sup> Bolsista CNPq: Graduação em Engenharia Ambiental e Sanitária, PUC, Campinas-SP. E-mail: elia59@live.com

<sup>b</sup> Orientador: Pesquisador Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP. E-mail: claudio.jonsson@embrapa.br

<sup>c</sup> Colaborador: Doutoranda em Biologia Funcional e Molecular. E-mail: zairaclemente@hotmail.com

<sup>c</sup> Colaborador: Pesquisadora Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP. E-mail: vera-lucia.castro@embrapa.br



**ABSTRACT** - We studied the effect on the activity of hepatic enzymes that acts in the intermediary metabolism, conjugation of xenobiotics and as antioxidants, due to the exposure (14 days) of the “pacu fish” (*Piaractus mesopotamicus*) to the fungicides epoxiconazole, pyraclostrobin and its mixture. In the epoxiconazole exposure at  $22.8 \mu\text{g L}^{-1}$ , the activities of acid phosphatase (Pac) and superoxide dismutase (SOD) were increased significantly ( $p < 0.05$ ) compared to the control. This concentration is equivalent to 1/100 the median lethal concentration (LC50-96h) determined in fishes. There was no significant decrease or increase in the enzyme activities in fishes exposed to pyraclostrobin or pyraclostrobin+epoxiconazole mixture. We assigned values equivalent to 1.8 and  $2.0 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectively for pyraclostrobin and pyraclostrobin+epoxiconazole mixture, which would be regarded as the no observed effect concentration (NOEC). The value of this parameter to the epoxiconazole would be equivalent to  $2.28 \mu\text{g L}^{-1}$ . Data are relevant in the identification of candidate biomarkers and in guiding public policies regarding the setting of maximum levels of pollutants in the water for protection of the aquatic biota.

**Key words:** *Piaractus mesopotamicus*, toxicity, fungicide, enzyme, agrochemical mixture

## 1 INTRODUÇÃO

O uso combinado de dois ou mais fungicidas na agricultura vem sendo amplamente realizado. No mercado brasileiro são encontradas várias formulações combinadas de fungicidas e entre os quais, os pertencentes às classes dos triazóis e estrobilurinas, como o epoxiconazol e a piraclostrobina, respectivamente. Estes compostos, além de terem seu uso registrado para várias culturas do país, têm sido amplamente utilizados no nordeste do estado do PR para controlar a Sigatoka-negra da banana causada pelo fungo *Mycosphaerella fijiensis* (Benchimol et al., 2010).

Pelas características inerentes de sua utilização, fungicidas podem atingir os ambientes aquáticos circundantes aos locais de aplicação, contaminando águas superficiais e causando injúria à fauna e à flora aquática presente.

Apesar de serem encontrados na literatura trabalhos relativos aos efeitos ecotoxicológicos dos triazóis sobre organismos aquáticos, são poucos os estudos sobre as estrobilurinas ou as duas substâncias conjugadas, tampouco são encontrados dados sobre o grau de sinergismo do uso conjugado das duas substâncias sobre tais organismos. O pacu (*Piaractus mesopotamicus*) é um



## VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013 13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

peixe da família Characidae, largamente distribuído em território brasileiro, sendo originalmente encontrado na Bacia do Prata e no Pantanal. É de grande interesse econômico na aqüicultura, sendo a segunda espécie nativa mais cultivada no Brasil (Dos Santos et al., 2012).

Enzimas que atuam no metabolismo intermediário, na conjugação de xenobióticos e como antioxidantes tem sido bastante estudadas como biomarcadoras em decorrência da presença de agrotóxicos em compartimentos ambientais.

No presente trabalho são apresentados os efeitos dos fungicidas epoxiconazol e a piraclostrobina na alteração da atividade de algumas dessas enzimas.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

**Material-teste:** Foram testadas formulações de fungicidas à base de piraclostrobina (25,0% m/v; concentrado emulsionável), epoxiconazol (12,5% m/v; suspensão concentrada) e de sua mistura (piraclostrobina a 13,3% m/v e epoxiconazol a 5,0% m/v; suspo-emulsão), oriundas de apresentações comerciais disponíveis no mercado.

**Organismos-teste e exposição aos fungicidas:** os ensaios foram conduzidos com peixes pacus (*Piaractus mesopotamicus*) pesando em média 9 g, adquiridos de um fornecedor local. Os peixes foram aclimatados por pelo menos 7 dias em água de clorinizada com dureza total de 36 mg.L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub>, pH 7,2, temperatura de 27±2 °C, fotoperíodo de 16h luz/8h escuro. As concentrações subletais utilizadas corresponderam a 1:10; 1:100 e 1:1000 da CL50-96h obtida anteriormente para o peixe *Colossoma macropomum* (família Characidae).

Grupos de cinco peixes foram alocados em aquários de vidro com volume útil de 10 litros contendo as soluções-teste que foram renovadas duas vezes por semana. Os aquários foram providos de aeração constante. Para a piraclostrobina avaliaram-se as concentrações de 1,8; 0,18 e 0,018 µg.L<sup>-1</sup>. Para o epoxiconazol avaliaram-se as concentrações de 228,0; 22,8 e 2,28 µg.L<sup>-1</sup>. Para a mistura piraclostrobina + epoxiconazol (72,7% + 27,3%, respectivamente) foram avaliadas as concentrações de 2,0; 0,2 e 0,02 µg.L<sup>-1</sup>. Os ensaios foram conduzidos em réplicas de dois aquários por cada concentração testada sendo avaliados paralelamente dois recipientes isentos do agente tóxico, que serviram como controle. Os peixes foram alimentados *ad libitum* uma vez ao dia durante o período de exposição de 14 dias. Foram avaliados sinais de anormalidade comportamental, mortalidade e alterações na atividade das enzimas do metabolismo intermediário,



## VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013 13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

de conjugação e de estresse oxidativo (fosfatase ácida, fosfatase alcalina, glutathione-S-transferase, superóxido dismutase e catalase). Para estes últimos estudos, ao final da exposição, os animais foram anestesiados com benzocaína ( $190 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) e sacrificados por secção medular. Realizou-se imediatamente a necrópsia para a extração dos fígados. Estes foram armazenados em ultrafreezer ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) até o seu processamento.

**Preparo das amostras:** o fígado foi pesado e homogeneizado em tampão fosfato  $0,5\text{M}$  pH 7 ( $1:4$  w/v). Os homogenatos foram centrifugados a  $10.000 \times g$ , durante 20 min, a  $4^{\circ}\text{C}$ . Alíquotas do sobrenadante foram armazenadas em tubos *ependorf* a  $-80^{\circ}\text{C}$ , para posteriores análises bioquímicas. As atividades de fosfatase ácida (Fac), glutathione-S-transferase (GST), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e concentração de proteínas foram determinadas segundo Clemente et al. (2013). A fosfatase alcalina (Falc) foi determinada similarmente à Fac, porém em pH 9,4 e em presença de  $\text{Mg}^{+2}$  como cofator.

**Análise estatística:** para investigar os efeitos dos tratamentos sobre as variáveis resposta, foram utilizados modelos lineares generalizados (GLM). Para as variáveis onde houve evidência de variâncias heterogêneas, o GLM foi ajustado pelo método dos quadrados mínimos ponderados, considerando as variâncias de cada tratamento como pesos. As análises foram realizadas utilizando o software estatístico Statgraphics Plus 5.1 (MANUGISTICS, 2001).

### 3 RESULTADOS DISCUSSÃO

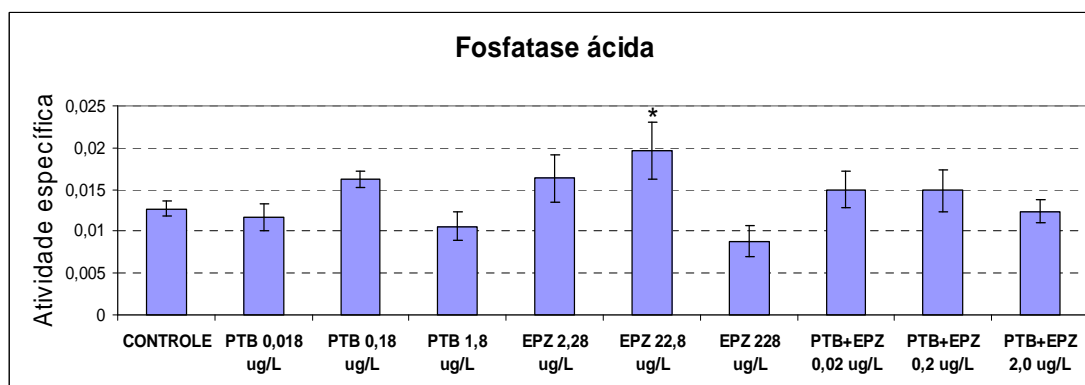
Os resultados referentes às exposições dos peixes aos fungicidas, individualmente e à sua mistura, estão apresentados nas Figuras 1 a 5. Os dados demonstram que as atividades da Fac e SOD foram aumentadas significativamente ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle nas exposições ao epoxiconazol na mesma concentração, ou seja,  $22,8 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Figuras 1 e 4). Os aumentos foram de aproximadamente 54 e 75 % em relação ao controle, respectivamente, para a Fac ( $p = 0,03$ ) e SOD ( $p = 0,04$ ). Para esse fungicida, as atividades da Falc, CAT e GST não foram significativamente afetadas nas concentrações testadas. Porém, para esta última enzima, observou-se um incremento de 48% da sua atividade na mesma concentração.

Com relação aos efeitos da piraclostrobina e à mistura epoxiconazol+piraclostrobina, não se observou decréscimo ou incremento das atividades das enzimas avaliadas.

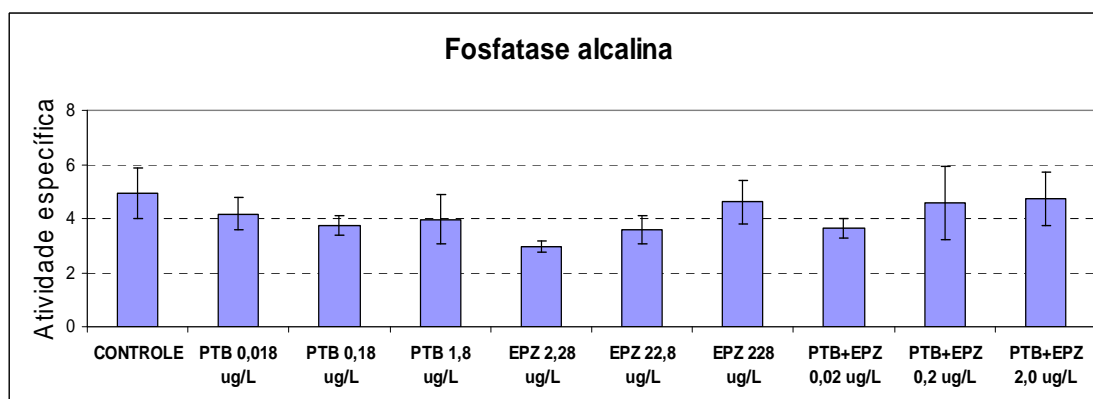
Alterações fisiológicas e bioquímicas em organismos aquáticos em níveis de até  $1/100$  da CL50 têm sido relatadas para outros agroquímicos (Sancho et al., 2009).



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013  
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

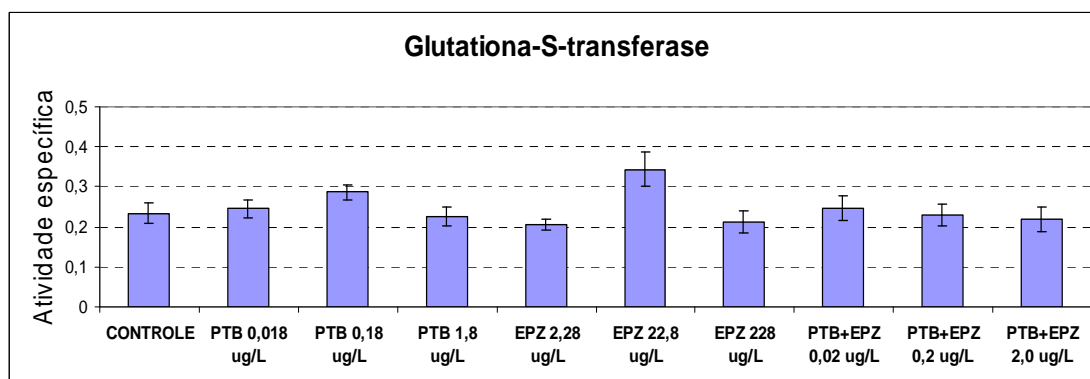


**Figura 1.** Atividade de Fac ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) de fígado de *Piaractus mesopotamicus* exposto a diferentes concentrações ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) de epoxiconazol (EPZ), piraclostrobina (PTB) e sua mistura (EPZ+PTB) durante 14 dias. Os valores representam as médias  $\pm$  erro-padrão de 5-9 determinações. \*diferença significativa ( $p<0,05$ ) em relação ao controle.

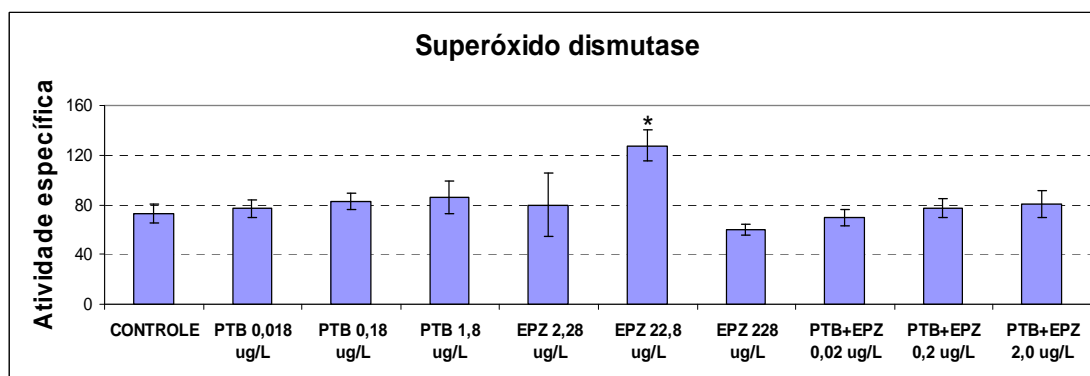


**Figura 2.** Atividade de Falc ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) de fígado de *Piaractus mesopotamicus* exposto a diferentes concentrações ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) de epoxiconazol (EPZ), piraclostrobina (PTB) e sua mistura (EPZ+PTB) durante 14 dias. Os valores representam as médias  $\pm$  erro-padrão de 5-8 determinações.

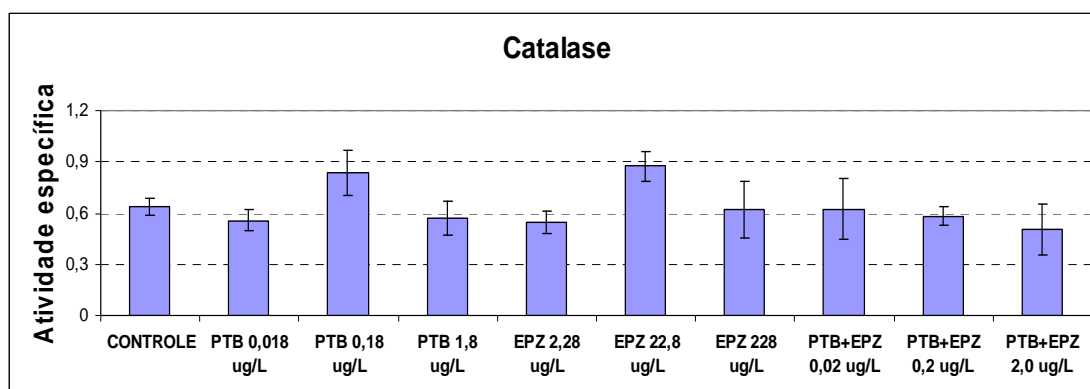
Um argumento pelo fato de ter se observado aumento da atividade na concentração intermediária ( $22,8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), e não na maior concentração, seria que em altas concentrações do epoxiconazol outras vias de metabolização para a detoxificação do composto estariam sendo mais ativadas (Eggas *et al.*, 1999). Assim observa-se na literatura que o conceito dose-resposta não é necessariamente contemplado no caso de alterações de atividade enzimática. Otitoju e Onwurah (2005) observaram marcante inibição da atividade específica da SOD pela permetrina na dose de 1%, enquanto que a atividade praticamente não foi alterada na dose de 10%.



**Figura 3:** Atividade de GST ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) de fígado de *Piaractus mesopotamicus* exposto a diferentes concentrações ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) de epoxiconazol (EPZ), piraclostrobina (PTB) e sua mistura (EPZ+PTB) durante 14 dias. Os valores representam as médias  $\pm$  erro-padrão de 5-9 determinações.



**Figura 4.** Atividade de SOD ( $\text{U}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) de fígado de *Piaractus mesopotamicus* exposto a diferentes concentrações ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) de epoxiconazol (EPZ), piraclostrobina (PTB) e sua mistura (EPZ+PTB) durante 14 dias. Os valores representam as médias  $\pm$  erro-padrão de 5-9 determinações. \*diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle.



**Figura 5.** Atividade de CAT ( $\text{mmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) de fígado de *Piaractus mesopotamicus* exposto a diferentes concentrações ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) de epoxiconazol (EPZ), piraclostrobina (PTB) e sua mistura (EPZ+PTB) durante 14 dias. Os valores representam as médias  $\pm$  erro-padrão de 5-9 determinações.



## VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013 13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

Vários estudos têm demonstrado que poluentes químicos induzem a produção de espécies reativas de oxigênio, cuja ação deletéria pode ser neutralizada por defesas antioxidantes. A atividade de enzima SOD previne os efeitos adversos do estresse oxidativo que se manifesta se as defesas antioxidantes diminuem, ou quando a produção de espécies reativas de oxigênio aumentam.

Segundo Gill *et al.* (1991) o aumento da atividade da Pac verificado em exposições a poluentes seria explicado como uma adaptação bioquímica às necessidades metabólicas aumentadas pelo estresse ao agente tóxico, já que esta enzima está envolvida no metabolismo do fosfato. Pelo fato de ser uma enzima lisossomal, está envolvida em processos de detoxificação (Campbell *et al.* 1977).

Devido à ausência de mudanças nas atividades das enzimas avaliadas, de mortalidade dos organismos-teste e de comportamento anormal dos mesmos, podemos atribuir valores de 1,8 e 2,0  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , respectivamente para piraclostrobina e a mistura epoxiconazol + piraclostrobina, que seriam considerados concentrações de efeito não observado (CENO). O valor deste parâmetro para o epoxiconazol seria equivalente a 2,28  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , pois foram constatados efeitos na concentração imediatamente superior. Portanto, precauções devem ser tomadas quanto ao manejo agrícola e monitoramento associado a estes compostos já que a aplicação direta sobre uma coluna de água de 30 cm de profundidade, na sua dose de aplicação recomendada, proporcionaria resíduos de aproximadamente 66, 30 e 90  $\mu\text{g.L}^{-1}$  para a piraclostrobina, epoxiconazol e a mistura de ambos, respectivamente.

#### 4 CONCLUSÃO

Perante os resultados obtidos, a Fac e a SOD seriam consideradas enzimas biomarcadoras eficazes para presença de epoxiconazol. A carência de dados na literatura sobre a toxicidade dos compostos aqui estudados e a necessidade de inclusão de vários agrotóxicos na legislação nacional que determina concentrações máximas em compartimentos ambientais, tornam relevantes os dados do presente trabalho para o direcionamento de políticas públicas de proteção da biota aquática.



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013  
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

## 5 AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, à Fapesp e à Embrapa Meio Ambiente pelo apoio financeiro concedido e pela infra-estrutura fornecida.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Benchimol, R. L., Verzignassi, J. R.; de Matos, A. P., Santos, M. F.; Poltronieri, L. S. e Silva, C. M. Primeiro relato de Sigatoka-negra no Nordeste paraense. **Revista de Ciências Agrárias**, n.53, v.1, p.108-111. 2010.

Campbell, R.M.; Dinsdale, D.; Fell, F. Localization of acid phosphatase activity in the liver of pregnant rats. **Histochemical Journal**, v. 9, p.43-60, 1977.

Clemente, Z; Castro, V.L.; Feitosa, L.O.; Lima, R.; Jonsson, C.M.; Maia, A.H.N. e Fraceto, L.F.. Fish exposure to nano-TiO<sub>2</sub> under different experimental conditions: Methodological aspects for nanoecotoxicology investigations. **Science of the Total Environment**, v.463–464, p. 647–656, 2013.

Dos Santos V. B.; Santos R. S.; Salomão, R. A. S. e da Silva, R. M. *Reprodução induzida de pacu (piaractus mesopotamicus) com o uso de diferentes hormônios comerciais*. **Pesquisa & tecnologia**, vol. 9, n. 1, jan-jun 2012.

Egaas, E.; Sandvick, M.; Fjeld, E.; Kallqvist, T.; Goksoyr, A. e Svensen, A. Some effects of the fungicide propiconazole on cytochrome P450 and glutathione S-transferase in brown trout (*Salmo trutta*). **Comparative Biochemistry and Physiology C; Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v.122, p.337- 344, 1999.

Gill, T. S.; Tewari, H. e Pande, J. in vivo and in vitro effects of cadmium on selected enzymes in different organs of the fish *Barbus conchonus* Ham. (Rosy barb). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology**, v. 100, n. 3, p. 501-505, 1991.

Manugistics **Statgraphics Plus**: version 5.1 for Windows. Rockville, 2001.

Otitoju, O. e Onwurah, I. N. E. Superoxide dismutase (SOD) activity and serum calcium level in rats exposed to a locally produced insecticide “Rambo Insect Powder”. **Animal Research International**, v. 2, n. 1, p. 261–266, 2005.

Sancho, E. e Fernández-Vega, C.; Villarroel M.J.; Andreu-Moliner, E.; Ferrando, M. D.. Physiological effects of tricyclazole on zebrafish (*Danio rerio*) and post-exposure recovery. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C** v. 150 p. 25–32, 2009.