

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA
FARMACOLOGIA APLICADA A PRODUÇÃO ANIMAL**

**PRODUTOS APÍCOLAS COMO ANTIOXIDANTES EM
PEIXES FRENTE A DESAFIOS OXIDANTES
PROVOCADOS POR TEBUCONAZOLE**

TESE DE DOUTORADO

DAIANE FERREIRA

Santa Maria, RS, BRASIL

2013

**PRODUTOS APÍCOLAS COMO ANTIOXIDANTES EM
PEIXES FRENTE A DESAFIOS OXIDANTES PROVOCADOS
POR TEBUCONAZOLE**

Daiane Ferreira

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, área de farmacologia aplicada a produção animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM,RS), como requisito final para obtenção do título de

Doutora em Farmacologia

Orientador: Profº. Dr Leonardo José Gil Barcellos

SANTA MARIA, RS, Brasil

2013

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Ferreira, Daiane
PRODUTOS APÍCOLAS COMO ANTIOXIDANTES EM PEIXES FRENTE
A DESAFIOS OXIDANTES PROVOCADOS POR TEBUCONAZOLE /
Daiane Ferreira.-2013.
68 p.; 30cm

Orientadora: Leonardo José Gil Barcellos
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia, RS, 2013

1. Estresse oxidativo 2. Produtos Apícolas 3.
Tebuconazole 4. Jundiá I. Gil Barcellos, Leonardo José
II. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA
FARMACOLOGIA APLICADA A PRODUÇÃO ANIMAL**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a tese de doutorado

**PRODUTOS APÍCOLAS COMO ANTIOXIDANTES EM PEIXES FRENTE A
DESAFIOS OXIDANTES PROVOCADOS POR TEBUCONAZOLE**

elaborada por

Daiane Ferreira

como requisito final para obtenção do grau de **Doutor em Farmacologia**

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Leonardo José Gil Barcellos

(Presidente/Orientador)

Profa. Dra. Maria Amália Pavanato (UFSM)

Profa. Dra. Berta Maria Heinzmann (UFSM)

Profa. Dra. Tais Cristina Unfer (UFSM)

Profa. Dra. Luciane Maria Colla (UPF)

Santa Maria, 25 de outubro de 2013.

*Dedico esta conquista aos meus pais, que, aceitaram sem questionar,
como seus, os meus sonhos. Sempre me incentivando, apoiando e
sustentando-me em suas bases fortes de amor, carinho, proteção e luta.*

*Nunca me deixando desistir.
Esta vitória também é de vocês.
Com amor.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela eterna bondade, força e oportunidade a mim concedidas para que eu pudesse dar esse importante passo em minha vida.

Aos meus pais, pela vida, amor, carinho e confiança. Por ser sempre meu porto seguro diante das tantas adversidades. Pelas palavras e gestos de incentivo. Vocês são tudo para mim.

Aos meus dois anjos da guarda, Marieta (*in memoriam*) e Tia “Bita”, pelo fundamental apoio, muitas vezes financeiro, pelo amor, pelas muitas orações e pelo orgulho que sempre tiveram de mim. Sempre me fazendo acreditar que iria valer a pena. A vocês todo amor, admiração e respeito.

As minhas irmãs Sandra, Simone, Silvane e Andriele (sempre tão ouvintes e cheias de palavras incentivadoras), ao meu irmão Rafael, aos amados sobrinhos Lucas (filho, irmão, amigo, companheiro...), Maurício e Murilo (a dupla “M&Ms”), que com um sorriso e carinho renovaram minhas forças, meus queridos cunhados Fagner (jamais esquecerei o email intitulado “pra dar força”) e Ben Hur, que sempre me apoiaram e acreditaram no meu trabalho.

A Lucimara, minha fiel escudeira, pelo carinho, amor, ajuda pessoal, profissional e acadêmica, conversas renovadoras, descontraídas, felizes. Por todas as palavras de incentivo, pelas milhares de gargalhadas e por me fazer acreditar mais em mim.

Ao meu esposo Gilson, pelo carinho, amor, palavras incentivadoras e compreensão nessa etapa profissional de minha vida. Pelos momentos de descontração, pelas tentativas, sempre bem sucedidas, de me tirar da rotina maçante de trabalho. Obrigada por tudo.

Ao meu muito competente orientador, mestre, amigo, confidente... Dr. Leonardo Barcellos. Por toda dedicação, compreensão, conselhos, apoio e carinho. Não tenho palavras para agradecer, tanto a ele quanto a sua querida família, que me acolheu como se eu fosse um dos seus. Obrigada de coração.

Aos meus queridos colegas de laboratório, Ana, João, Thiago, Gessi, Darlan, Murilo, Michele e Ricardo, sem vocês essa pesquisa não teria resultados. Muito obrigada de coração.

A todos os citados, MUITO OBRIGADA POR TUDO. A realização deste sonho só é possível porque vocês estiveram ao meu lado.

A UFSM, ao PPGFARMACOLOGIA, aos demais professores, a CAPES pela bolsa concedida e a todos que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho, muito obrigada.

RESUMO

Resultados finais de tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria

PRODUTOS APÍCOLAS COMO ANTIOXIDANTES EM PEIXES FRENTE A DESAFIOS OXIDANTES PROVOCADOS POR TEBUCONAZOLE.

Autor: Daiane Ferreira

Orientador: Leonardo José Gil Barcellos

Este trabalho apresenta novas alternativas para mitigar efeitos deletérios causados por agroquímicos provenientes de lavouras, que contaminam açudes e corpos de água, localizados muito próximos às áreas de cultivo. Esta proximidade e contaminação causa danos oxidativos em peixes. A alternativa sugerida é o uso de produtos apícolas, que geram resíduos de baixo impacto para o meio ambiente. Uma vez que esta associação de culturas só vem crescendo. Foram testadas três concentrações diferentes de mel ($0,025\text{g L}^{-1}$; $0,075\text{g L}^{-1}$; $0,125\text{g L}^{-1}$), pólen apícola ($0,01\text{g L}^{-1}$; $0,03\text{g L}^{-1}$; $0,05\text{g L}^{-1}$), geleia real ($0,005\text{g L}^{-1}$; $0,015\text{g L}^{-1}$; $0,025\text{g L}^{-1}$) e própolis ($0,01\text{g L}^{-1}$; $0,05\text{g L}^{-1}$; $0,1\text{g L}^{-1}$) associadas e ou não ao fungicida tebuconazole ($0,088\text{mg L}^{-1}$). Os produtos apícolas apresentaram efeito protetor aos peixes, principalmente por inibir/reverter a peroxidação lipídica, carbonilação proteica e aumentar a atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase e glutathione-S-transferase, contribuindo para o estado redox da célula. Os dados apresentados sugerem o potencial do mel, pólen apícola, própolis e geleia real adicionados a água como substâncias protetoras contra o estresse oxidativo causado por agroquímicos, em especial o tebuconazole.

Palavras chave: estresse oxidativo, potencial antioxidante, mel, própolis, pólen apícola, geleia real, agroquímicos.

ABSTRACT

The final results of the thesis Doctoral Program Graduate Pharmacology

Universidade Federal de Santa Maria

BEE PRODUCTS AS ANTIOXIDANTS IN FISH FACE TO OXIDIZING CHALLENGES CAUSED BY TEBUCONAZOL.

Author: Daiane Ferreira

Advisor: Leonardo José Gil Barcellos

This paper present alternatives to mitigate the deleterious effects caused by pesticides from crops that contaminate ponds and water bodies, located very close to the growing areas. This proximity causes oxidative damage in fish. The suggested alternative is the use of bee products, which generate lower amounts of waste in the environment and has low cost. Since this organization has been growing crops only. We tested three different concentrations of honey (0,025g L⁻¹; 0,075g L⁻¹; 0,125g L⁻¹), bee pollen (0,01g L⁻¹; 0,03g L⁻¹; 0,05g L⁻¹), royal jelly (0,005g L⁻¹; 0,015g L⁻¹; 0,025g L⁻¹) and propolis (0,01g L⁻¹; 0,05g L⁻¹; 0,1g L⁻¹) and associated or not with fungicide tebuconazol (0,088mg L⁻¹), apiculture products showed protective effect on fish, mainly inhibit / reverse lipid peroxidation, protein carbonylation and increase the activity of catalase, superoxide dismutase and glutathione S-transferase, contributing to the redox state of the cell. Our data suggest the antioxidant potential of honey, bee pollen, propolis and royal jelly added to water as protective substances against oxidative stress caused by agrochemicals, especially tebuconazole.

Keywords: oxidative stress, antioxidant, honey, propolis, bee pollen, royal jelly, agrichemicals.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

FIGURA 1: Estrutura química do tebuconazole.....	19
FIGURA 2: Formação de radicais livres.....	21
FIGURA 3: Redução tetravalente do oxigênio molecular.....	22

ARTIGO 1

FIGURE 1: Levels of TBARS (nmol MDA mg ⁻¹ protein) and GSH (μmol GSH g ⁻¹ of wet tissue) in <i>Rhamdia quelen</i> after exposure to 16.6% of LC50 of tebuconazole, to bee product, and to tebuconazole + bee product for 96 h. Different small letters indicates statistical differences between the means (ANOVA followed by Tukey's multiple range test). Mean ± SEM; n = 10. * P < 0.05.....	36
--	----

ARTIGO 2

FIGURE 1: Levels of TBARS (nmol MDA mg ⁻¹ protein) and protein carbonyls (nmol carbonyl mg ⁻¹ protein) in <i>Rhamdia quelen</i> exposed to tebuconazole (TEB), royal jelly (RJ) or a combination of RJ and TEB. Contaminant-free (C). The different small letters indicate significant differences between the means (ANOVA followed by Tukey's multiple range test). The values represent the means ± SEM; n = 12. p < 0.05.....	41
--	----

FIGURE 2: Levels of Glutathione-S-transferase (GST, mmol GS-DNB min ⁻¹ mg protein ⁻¹), catalase (CAT, mmol min ⁻¹ mg protein ⁻¹) and superoxide dismutase (SOD, IU SOD mg protein ⁻¹) activities in <i>Rhamdia quelen</i> exposed to tebuconazole (TEB), royal jelly (RJ) or a combination of RJ and TEB. Contaminant-free (C). The different small letters after the means indicate significant differences (ANOVA) followed by Tukey's multiple range test); p < 0.05, n = 12.....	42
---	----

FIGURE 3: Levels of TBARS (nmol MDA mg ⁻¹ protein) and protein carbonyls (nmol carbonyl mg ⁻¹ protein) in <i>Rhamdia quelen</i> exposed to tebuconazole (TEB), honey (H) or a combination of H and TEB. Contaminant-free (C). The different small letters indicate significant differences between the means (ANOVA followed by Tukey's multiple range test). The values represent the means ± SEM; n = 12. p < 0.05.....	43
--	----

FIGURE 4: Levels of Glutathione-S-transferase (GST, mmol GS-DNB min⁻¹mg protein⁻¹), catalase (CAT, mmol min⁻¹mg protein⁻¹) and superoxide dismutase (SOD, IU SOD mg protein⁻¹) activities in *Rhamdia quelen* exposed to tebuconazole (TEB), honey (H) or a combination of H and TEB. Contaminant-free (C). The different small letters after the means indicate significant differences (ANOVA followed by Tukey's multiple range test); p<0.05, n = 12.....44

FIGURE 5: Levels of TBARS (nmol MDA mg⁻¹ protein) and protein carbonyls (nmol carbonyl mg⁻¹protein) in *Rhamdia quelen* exposed to tebuconazole (TEB), propolis (P) or a combination of P and TEB. Contaminant-free (C). The different small letters indicate significant differences between the means (ANOVA followed by Tukey's multiple range test). The values represent the means ±SEM; n = 12. p<0.05.....45

FIGURE 6: Levels of Glutathione-S-transferase (GST,mmol GS-DNB min⁻¹mg protein⁻¹), catalase (CAT,mmol min⁻¹mg protein⁻¹) and superoxide dismutase (SOD, IU SOD mg protein⁻¹) activities in *Rhamdia quelen* exposed to tebuconazole (TEB), propolis (P) or a combination of P and TEB. Contaminant-free (C). The different small letters after the means indicate significant differences (ANOVA followed by Tukey's multiple range test); p<0.05, n = 12.....46

FIGURE 7: Levels of TBARS (nmol MDA mg⁻¹protein) and protein carbonyls (nmol carbonyl mg⁻¹protein) in *Rhamdia quelen* exposed to tebuconazole (TEB), bee pollen (BP) or a combination of BP and TEB. Contaminant-free (C). The different small letters indicate significant differences between the means (ANOVA followed by Tukey's multiple range test). The values represent the means ± SEM; n = 12. p<0.05.....47

FIGURE 8: Levels of Glutathione-S-transferase (GST, mmol GS-DNB min⁻¹mg protein⁻¹), catalase (CAT,mmol min⁻¹mg protein⁻¹)and superoxide dismutase (SOD, IU SOD mg protein⁻¹) activities in *Rhamdia quelen* exposed to tebuconazole (TEB), bee pollen (BP)or a combination of BP and TEB.Contaminant-free (C). The different small letters after the means indicate significant differences (ANOVA followed by Tukey's multiple range test); p<0.05, n = 12.....48

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

TABLE 1 : Glutathione-S-transferase, non protein thiols and ascorbic acid in *Rhamdia quelen* exposed to tebuconazole, honey, propolis or bee pollen and the combination of bee products and the fungicide. Different small letter after the means indicates significant difference, ANOVA followed by Tukey's multiple range test, $P < 0.05$, $n = 10$. Units: glutathione S-transferase, $\mu\text{mol GS-DNB min}^{-1}\text{mg protein}^{-1}$; reduced glutathione, $\mu\text{mol GSH g}^{-1}$ of wet tissue; non protein thiols, $\mu\text{mol SH g}^{-1}$ of tissue; ascorbic acid, $\mu\text{mol g}^{-1}$ of tissue. Different small letters indicates statistical differences between the means (ANOVA followed by Tukey's multiple range test).....36

LISTA DE ABREVIATURAS

CAT: catalase

CEPAGRO: Centro em Pesquisas Agronômicas da Universidade de Passo Fundo

EROs: espécies reativas de oxigênio

GSH: glutathiona reduzida

GST: glutathiona-S-transferase

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

LPO: lipoperoxidação

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MDA: malondialdeído

OH: radical hidroxil

O₂^{·-}: ânion radical superóxido

POPs: poluentes orgânicos persistentes

RL: radicais livres

SOD : superóxido dismutase

TBA: acido tiobarbitúrico

TEB: tebuconazole

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1 JUNDIÁ (<i>Rhamdia quelen</i>).....	18
2.2 FUNGICIDA TEBUCONAZOLE	19
2.3 ESTRESSE OXIDATIVO	20
2.4 INDICADORES PRÓ-OXIDANTES.....	23
2.5 DEFESAS ANTIOXIDANTES	24
2.6 PRODUTOS DE ORIGEM APÍCOLA	25
2.6.1 MEL	26
2.6.2 PRÓPOLIS	27
2.6.3 PÓLEN APÍCOLA.....	27
2.6.4 GELEIA REAL	28
2.7 PRODUTOS DE ORIGEM APÍCOLA E SUA IMPORTÂNCIA NOS PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO	29
3. OBJETIVOS	29
3.1 OBJETIVO GERAL	29
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
4. ASPECTOS AMBIENTAIS	30
4.1 TEMPO DE EXPOSIÇÃO.....	31
4.2 PRODUTOS TESTADOS	31
5. PRINCIPAIS CONTRIBUIÇÕES CIENTÍFICAS, TECNOLÓGICAS E DE INOVAÇÃO.	31
6. RESULTADOS.....	32
6.1 Antioxidant activity of bee products added to water in tebuconazole-exposed fish.	32
Daiane Ferreira, Taís Cristina Unfer, Hélio Carlos Rocha, Luiz Carlos Kreutz, Gessi Koakoski and Leonardo José Gil Barcellos	32

6.2 Bee Products Prevent Agrichemical-Induced Oxidative Damage in Fish.....	39
Daiane Ferreira, Helio Carlos Rocha, Luiz Carlos Kreutz, Vania Lucia Loro, Alessandra Marqueze, Gessi Koakoski, João Gabriel Santos da Rosa, Darlan Gusso, Thiago Acosta Oliveira, Murilo Sander de Abreu, Leonardo José Gil Barcellos.....	39
7.DISCUSÃO GERAL	51
8.CONCLUSÃO.....	52
9. PERSPECTIVAS FUTURAS	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o País que apresenta o maior potencial do mundo para a produção de pescado através da aquicultura, tendo em vista a vastidão de seu território, com mais de 2/3 ocupando a região tropical, bacias hidrográficas privilegiadas e ricas, onde se destaca a bacia amazônica responsável por 20% da água doce do mundo. Merece ainda destacar os cinco milhões de hectares de águas represadas em açudes (somente no Nordeste) e reservatórios construídos para a geração de energia hidroelétrica ou para abastecimento urbano e, também, a imensidade de seus mais de oito mil quilômetros de costa que possibilita uma enorme e variada atividade de aquicultura de espécies marinhas (Anualpec, 2002).

O ambiente aquático recebe, continuamente, compostos químicos exógenos ou xenobióticos, liberados pelas comunidades urbanas, propriedades rurais e indústrias. A partir do século XX, além das cargas orgânicas convencionais, muitos outros poluentes, tais como pesticidas organoclorados, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (polycyclic aromatic hydrocarbons - PAHs), bifenilas policloradas (polychlorinated biphenyls - PCBs), dioxinas e furanos, vêm sendo produzidos e, em parte, liberados no ambiente (Van Der Oost *et al.*, 2003).

O uso do conjunto de práticas agrícolas e piscicultura vêm crescendo de forma significativa em todo país, principalmente no sul. As atividades de origem agrícola oferecem riscos à qualidade das águas subterrâneas e superficiais, pois muitas lagoas utilizadas para a cultura de peixe estão localizadas muito perto de áreas agrícolas. Como resultado, pequenas quantidades de tais produtos podem atingir os tanques utilizados para a cultura de peixe (Van der Oost *et al.*, 2003).

Os ecossistemas aquáticos tropicais estão entre os mais ameaçados pelas atividades humanas e pela degradação ambiental, mas ainda são poucas as pesquisas realizadas para avaliar e monitorar o impacto de contaminantes nesses ecossistemas tropicais e em sua biota aquática (Lacher & Goldstein, 1997; Bozzetti & Schulz, 2004).

No Brasil, a mais recente resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (Conama) que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento (Brasil, 2005), proíbe o lançamento dos produtos orgânicos persistentes (POPs) nos efluentes e determina que, quando apropriado, a qualidade dos ambientes aquáticos poderá ser avaliada por indicadores biológicos utilizando-se organismos e/ou comunidades aquáticas.

Em um sistema biológico, a ordem sequencial das alterações promovidas pela presença de poluentes ocorre em níveis crescentes de organização biológica, estendendo-se do nível molecular ou bioquímico para o nível fisiológico ou individual, até os níveis da população e ecossistema (Stegeman *et al.*, 1992). Assim, de acordo com o nível de organização biológica a que se referem, os diferentes parâmetros utilizados como indicadores biológicos para sinalizar as mudanças associadas à presença de contaminantes podem ser agrupados como biomarcadores, bioindicadores ou indicadores ecológicos.

A pesquisa científica da última década mostrou e comprovou uma série de efeitos oxidativos dos defensivos agrícolas nos peixes e outros organismos aquáticos (Santos *et al.*, 2003).

Nos últimos anos tem-se observado uma intensa pesquisa sobre as propriedades antioxidantes de produtos naturais a fim de buscar alternativas economicamente viáveis e com menor impacto ambiental, para reversão ou atenuação dos danos causados por agroquímicos. O conhecimento das importantes funções que os antioxidantes desempenham na inibição dos radicais livres (RL) resultantes do metabolismo celular, tem motivado o interesse pela análise destes compostos em diversos produtos e também na sua forma *in natura* (Gheldof & Engeseth, 2002).

A poluição dos ecossistemas aquáticos pode provocar a perda da biodiversidade. A poluição em nível de população tem degradado ecossistemas fundamentais por meio de alterações moleculares nos peixes, refletindo na diminuição da qualidade e da sustentabilidade destes ecossistemas. A contaminação dos recursos aquáticos no nível de organismo é alvo de preocupações humanas, tendo em vista que o consumo direto e indireto de peixes e água contaminada pode causar sérios danos ao organismo (Ramsdorf, 2007).

O presente trabalho está embasado na apresentação dos resultados obtidos sob a forma de artigos publicados, para fins de defesa de tese de Doutorado, dispondo das seguintes seções: revisão bibliográfica, objetivos, artigos publicados, discussão geral e perspectivas para trabalhos futuros.

A seção de Revisão Bibliográfica abordará uma breve elucidação sobre o crescente uso da produção combinada agricultura/piscicultura. Estudos já citados na literatura sobre espécies animais envolvidas nesta produção combinada, os agentes xenobióticos (agroquímicos) que causam alterações nos organismos que entram em contato com os mesmos. Os tipos de danos que podem ser causados, bem como um entendimento de práticas que podem ser abordadas como alternativas para reduzir tais danos ou até mesmo reverter tais efeitos deletérios causados por agroquímicos.

Na seção de Artigo Publicado e Artigo aceito para publicação, serão apresentados resultados finais que compõem esta pesquisa. Nestas mesmas seções encontram-se os demais itens como materiais e métodos, análise estatística aplicada nos dados obtidos, resultados e discussão e referências bibliográficas para ambos os trabalhos.

A seção de Discussão Geral apresenta resultados obtidos e sua correlação entre si e com dados já apresentados na literatura. Finalmente, será abordado na seção “Perspectivas Futuras”, demais estudos que poderão ser realizados para se obter uma maior elucidação dos dados já encontrados. E futuros trabalhos para aplicação prática do que se estudou neste trabalho.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*)

O Jundiá, *Rhamdia quelen* da família Heptapteridae, ordem Siluriformes, gênero *Rhamdia* e classe Osteichthyes, é uma espécie promissora para cultivo de peixes sendo encontrado desde o centro da Argentina até o sul do México, no Brasil está presente na região da Depressão Central do Rio Grande do Sul (Guedes, 1980). Aspectos de sua fisiologia reprodutiva (Barcellos *et al.*, 2001b, 2002), resposta ao estresse (Barcellos *et al.*, 2004, 2006 a, b.), toxicologia (Soso *et al.*, 2007; Kreutz *et al.*, 2008) e fisiologia geral (Bello *et al.*, 2000) têm sido estudados. É uma espécie capaz de suportar o forte frio do inverno dos países do sul da América do Sul e crescer rapidamente no verão. Quando cultivado a uma densidade de 2 a 4 peixes/m² pode alcançar 600-800 g de peso corporal em oito meses. (Barcellos *et al.*, 2003).

É um peixe de água doce, omnívoro com tendência piscívora preferindo crustáceos, insetos, restos vegetais e detritos orgânicos. Apresenta barbilhões localizados junto à boca, que provavelmente possuem receptores de gosto para ajudar na localização do alimento e na percepção da água (Gomes *et al.*, 2000). Possui hábito noturno e vive em lagos e poços fundos dos rios, preferindo ambientes de águas mais calmas com fundo de areia e lama, junto às margens e vegetação (Gomes *et al.*, 2000).

Devido a sua prolificidade, robustez e bom ganho de peso, a espécie tem sido intensivamente pesquisada por vários grupos de pesquisa, tanto em pesquisa aplicada (alternativa de produção de peixes), quanto em pesquisa básica (Barcellos *et al.*, 2003).

2.2 FUNGICIDA TEBUCONAZOLE

O tebuconazole (TEB) (Figura 1) é um fungicida utilizado em lavouras de cereais. Seu potencial de periculosidade ambiental enquadra-se na classe II, muito perigoso ao meio ambiente e altamente tóxico para organismos aquáticos, segundo o IBAMA. Possui ação sistêmica e persistência de 20-25 dias no ambiente. A formulação comercial Folicur® é classificada como substância tóxica para organismos aquáticos e pode causar estresse oxidativo (Ferreira *et al.*, 2010, Toni *et al.*, 2011), disrupção endócrina (Cericato *et al.*, 2008) com efeitos diretos nas células adrenais (Cericato *et al.*, 2009) em peixes como o jundiá. Este fungicida é caracterizado pelo mecanismo de ação denominado IBE (inibidor da biossíntese de ergosterol).

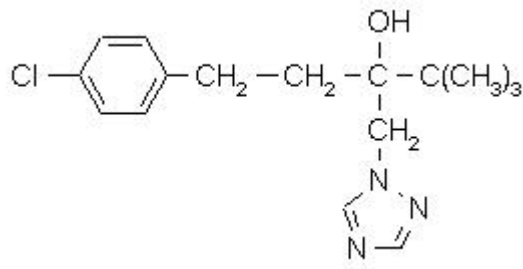


Figura 1: Estrutura química do tebuconazole. Obanda, 2008.

Embora as novas formas de cultura, como os transgênicos, façam uso de uma menor quantidade de agroquímicos, o uso dos mesmos é muito frequente. Uma vez que a maioria das inovações não impede a proliferação de ervas daninhas e pragas que prejudicam o bom desenvolvimento das lavouras. Tebuconazole é um xenobiótico bastante utilizado nos sistemas agrícolas no controle de fungos que atacam as lavouras de cebola, batata, cevada, feijão, maçã, uva e mais recentemente, em lavouras de soja, sendo o mais eficaz contra fungos em culturas de soja transgênica (Fortes Neto *et al.*, 2007).

Nas indústrias produtoras de tebuconazole, o efluente gerado apresenta alta toxicidade aos organismos aquáticos, impedindo que o mesmo seja degradado em estações de tratamento de efluentes. Seus impactos sobre a microbiota do solo e dos processos biológicos são

difícilmente determinados com precisão, devido à natureza, heterogeneidade, dinâmica e respostas adaptativas da comunidade microbiana (Fortes Neto *et al.*, 2007).

A transformação ou degradação dos pesticidas no solo ocorrem em função de várias reações bióticas e abióticas que compreendem reações primárias (oxidação, redução e hidrólise) e secundárias (conjugações e reações com constituintes do solo). O pesticida ideal seria aquele que cumpre seu objetivo e seja degradado rapidamente a compostos secundários e mineralizado formando CO₂, água, produtos orgânicos e inorgânicos mais simples (Fortes Neto *et al.*, 2007).

Quanto aos mecanismos de ação, bioacumulação e excreção, tebuconazole tem efeitos tóxicos sobre fígado, sangue e adrenais. É rapidamente absorvido a partir do trato gastrointestinal, atingindo concentrações plasmáticas de pico dentro de poucas horas. O seu metabolismo no corpo é efetuada principalmente por oxidação. A excreção do tebuconazole ocorre principalmente pelas vias fecal e urinária (www.agricultura.pr.gov.br). O fator de bioacumulação do tebuconazole foi de 65 (média) de peixe inteiro (medido em várias espécies de peixes) ([www.selectis.pt / Fichas_seg / Riza.pdf](http://www.selectis.pt/Fichas_seg/Riza.pdf)).

Os peixes são particularmente sensíveis à influência de pesticidas, pois eles são capazes de absorver e reter xenobióticos dissolvidos na água, por meio de transporte ativo ou passivo (Sancho *et al.*, 2010).

2.3 ESTRESSE OXIDATIVO

Nas últimas décadas, foram realizadas inúmeras pesquisas para esclarecer o papel dos radicais livres em processos patológicos. A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do metabolismo de organismos vivos, assim os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica. O excesso de radicais livres no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta (Barreiros *et al.*, 2006). Radical livre refere-se ao átomo ou molécula altamente reativos, que contêm número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. É este não emparelhamento de elétrons da última camada que confere alta reatividade a esses átomos ou moléculas (Halliwell & Gutteridge, 1990).

O estresse oxidativo (Figura2) é um processo patológico relacionado ao desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e sua detoxificação pelos sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Além disso, esse processo é considerado um importante mecanismo toxicológico para muitos xenobióticos lipofílicos.

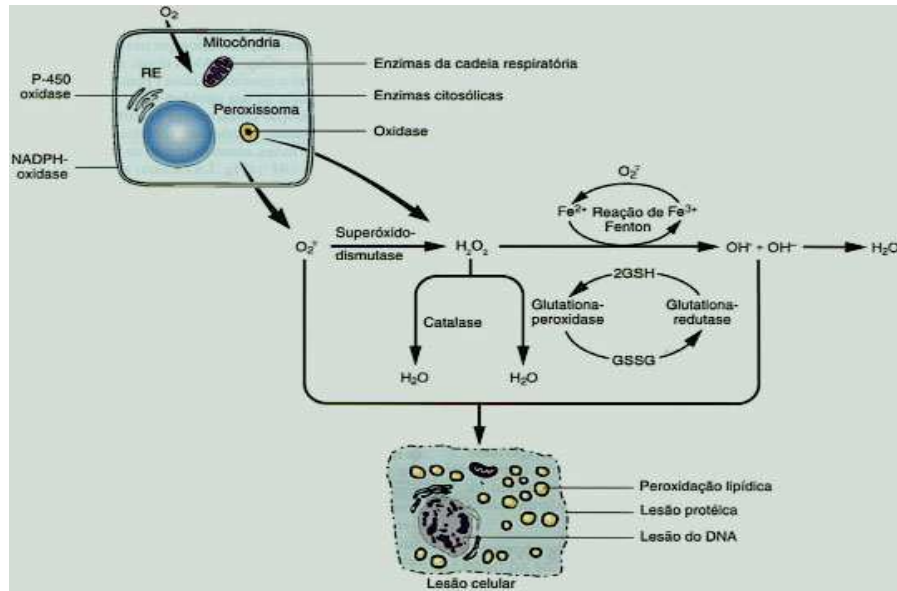


Figura 2: Formação de radicais livres (espécies reativas de oxigênio) e mecanismos antioxidantes biológicos. Adaptado de Nordberger & Arnér, 2001.

EROs (Figura 3) são espécies químicas presentes na maioria dos sistemas biológicos. Ocorrem naturalmente em grande parte das células eucarióticas devido ao metabolismo energético dependente do uso de oxigênio. Na cadeia transportadora de elétrons, localizada na membrana interna da mitocôndria, o O_2 recebe quatro elétrons e quatro prótons resultando na formação de duas moléculas de água. A redução parcial de oxigênio por adição de um elétron de cada vez, gera intermediários reativos, como os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroperóxido (HO_2^{\cdot}), hidroxila (OH) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

A reação de recuperação de dano à célula ocorre a partir do momento que uma molécula de oxigênio, parcialmente oxidada (agora um radical livre), entra na célula e gera EROS como ânion radical superóxido, radical hidroxil e peróxido de hidrogênio. Ao ser percebida dentro da célula, a molécula eletronicamente desemparelhada é imediatamente neutralizada pela ação da enzima superóxido dismutase, que catalisa a dismutação do peróxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio (Peskin & Winterbourn, 2000).

O peróxido de hidrogênio por si só, não é altamente reativo, mas por ser uma molécula instável, pode-se ligar a outras moléculas instáveis e gerar EROs. Níveis elevados de H_2O_2 podem liberar íons de ferro de heme proteínas, como hemoglobina e citocromo. O ferro (II) reduz H_2O_2 a radical hidroxila (HO^\bullet) (reação de Fenton) e catalisa a formação de HO^\bullet pela reação de Haber-Weiss. O HO^\bullet é o radical mais reativo encontrado *in vivo*. Para deter a ação do peróxido de hidrogênio, a enzima catalase, que vai decompor o peróxido de hidrogênio em duas moléculas de água e uma de oxigênio (Chelicani *et al.*, 2004). Quando esta interação de enzimas não acontece de maneira satisfatória ou é impedida de acontecer, as EROs podem gerar danos aos lipídios, lesão proteica e lesão do DNA (Halliwell & Gutteridge, 2002).

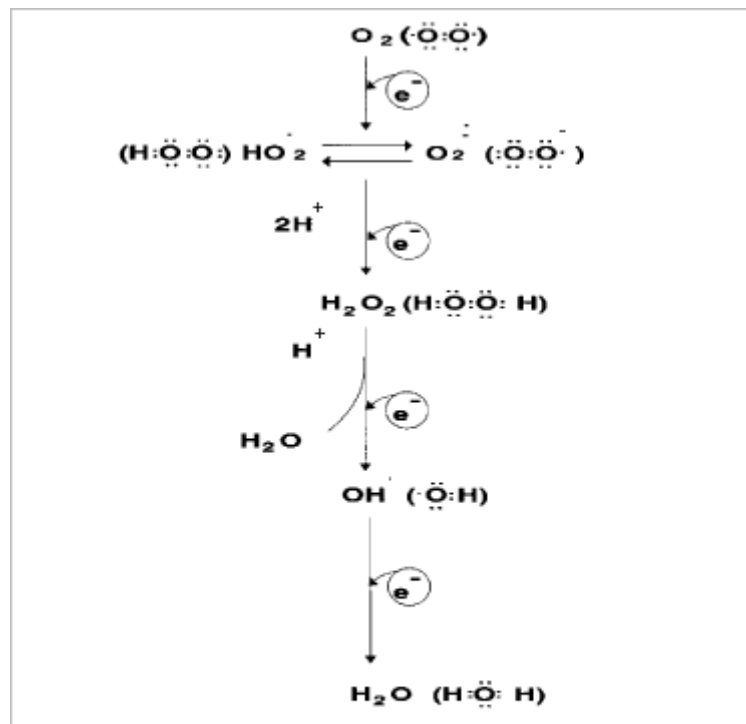


Figura 3: redução tetraivalente do oxigênio molecular na mitocôndria até a formação de água. Várias EROs são formadas no processo (Adaptado de Cohen 2000).

Estresse oxidativo seria como citado em Ahmad *et al.* (2000), Maran *et al.* (2009) e Modesto & Martinez (2010), que dizem: “o estresse oxidativo ocorre em situações em que há um desequilíbrio entre os níveis de antioxidantes e pró-oxidantes levando a uma produção excessiva de EROs”. Pode também ser definido como um desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes, onde a quantidade gerada do primeiro é maior, ocorrendo assim possíveis danos oxidativos (Üner *et al.*, 2005; Almroth *et al.*, 2008). Diversos estudos já evidenciaram

estresse oxidativo em peixes expostos a diferentes agroquímicos (Sayeed *et al.*, 2003; Bagnyukova *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005; Peixoto *et al.*, 2006; Moraes *et al.*, 2007, Ferreira *et al.*, 2010; Toni *et al.*, 2011).

As células possuem sistemas de defesa enzimáticos e não-enzimáticos para proteger seus constituintes e manter seu estado redox. Sob condições fisiológicas normais, os efeitos nocivos das EROs são efetivamente neutralizados pelo sistema celular de defesa antioxidante, que geralmente consiste de enzimas e de pequenas moléculas antioxidantes (Dandapat, 2000).

Substâncias tóxicas são geradas durante o transporte de elétrons, reações enzimáticas, reações de auto-oxidação, ou ainda, pelo grupo heme de proteínas, e são comumente chamadas de espécies reativas de oxigênio (EROs), como o ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (OH) (Halliwell & Gutteridge, 2007). Podem reagir com macromoléculas biológicas e produzir a peroxidação lipídica (LPO), danos ao DNA e oxidação de proteínas, resultando no estresse oxidativo (Barata *et al.*, 2005; Monteiro *et al.*, 2006).

O H_2O_2 é o principal EROs que pode atuar como 2º mensageiro, porque ele é relativamente estável. Muitas EROs contribuem para a proliferação, migração e sobrevivência celular. O H_2O_2 em baixas concentrações é capaz de reverter a inibição de muitas enzimas, incluindo as fosfatases Halliwell & Gutteridge (2002).

Os sistemas biológicos oferecem condições favoráveis para ocorrência de reações de caráter oxidativo, devido à existência de lipídios insaturados nas membranas celulares, e pela abundância de reações oxidativas que ocorrem durante o metabolismo normal. A susceptibilidade de uma célula ou de um tecido ao estresse oxidativo depende de um grande número de fatores que incluem a disponibilidade de antioxidantes e a capacidade de inativação ou eliminação dos produtos oxidativos formados (Jordão Júnior *et al.*, 1998).

2.4 INDICADORES PRÓ-OXIDANTES

Os peróxidos produzidos podem ser quantificados indiretamente por um ensaio de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), que é utilizado para refletir a intensidade da peroxidação lipídica por meio da quantificação de um seus principais produtos finais – malondialdeído (MDA) (Lushchak *et al.* 2009).

Um dos mais conhecidos produtos da lipoperoxidação (LPO) é o malondialdeído (MDA), que é o produto final da degradação não enzimática de ácidos graxos poli-insaturados e é ensaiado com o ácido tiobarbitúrico (TBA) e expresso em substâncias reativas ao TBA (Lushchak & Bagnyukova, 2006; Oropesa *et al.*, 2009). Altos níveis de MDA elevam a formação de lipoperóxidos e indicam um aumento de LPO (Lushchak & Bagnyukova, 2006).

As EROs podem também causar prejuízo às proteínas (Sies *et al.*, 1993). O dano à estrutura proteica pode ocasionar diversas modificações nos resíduos dos aminoácidos bem como a formação de proteína carbonil (Stadtman, 2000). Alguns autores sugerem que a dosagem de carbonilação de proteínas em peixes pode ser usada como biomarcador complementar de estresse oxidativo (Parvez & Raisuddin, 2005).

2.5 DEFESAS ANTIOXIDANTES

As células possuem sistemas de defesa enzimáticos e não enzimáticos para proteger seus constituintes e manter seu estado redox. Sob condições fisiológicas normais, os efeitos nocivos das EROs são efetivamente neutralizados pelo sistema celular de defesa antioxidante, que geralmente consiste de enzimas e de pequenas moléculas antioxidantes (Dandapat, 2000). Uma substância antioxidante, por definição, é aquela capaz de inibir a oxidação ou, então, qualquer substância que, mesmo presente em baixa concentração, comparada ao seu substrato oxidável, diminui ou inibe a oxidação daquele substrato. Podem teoricamente prolongar a fase de iniciação ou inibir a fase de propagação, mas não podem prevenir completamente a oxidação (Jordão Júnior *et al.*, 1998). Um dos mecanismos das substâncias antioxidantes é agir contra os danos provocados pelos efeitos do processo fisiológico de oxidação no tecido animal. Alguns exemplos de antioxidantes são nutrientes-vitaminas e minerais, e enzimas-proteínas endógenas que ajudam nas reações químicas.

Dentro dos componentes do sistema antioxidante, destacam-se neste trabalho a superóxido desmutase SOD, que é a primeira enzima na linha de defesa antioxidante, responsável por catalisar a conversão do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio. Catalase (CAT) que catalisa a redução do H_2O_2 em H_2O e O_2 e, por isso, é considerada um dos maiores componentes da defesa antioxidante primária (Gaetani *et al.*, 1989).

A glutationa-S-transferase (GST) é considerada uma enzima de detoxificação de xenobióticos por metabolizar uma grande variedade de substratos hidrofóbicos e eletrofílicos, por meio da conjugação destes com a glutationa reduzida (GSH), formando conjugados solúveis em água, reduzindo sua toxicidade e facilitando sua excreção (Wilce & Parker, 1994; Van Der Oost *et al.*, 2003).

Da mesma forma, o sistema de defesa antioxidante não enzimático atua impedindo reações de auto-oxidação e tem sido vinculado com a redução de radicais livres (Sayeed *et al.*, 2003). Os tióis não-protéicos têm uma importante função na defesa contra EROs, ligando-se aos radicais livres e os transformando em formas inertes (Massela *et al.*, 2005; Parvez & Raisuddin, 2005).

O ácido ascórbico (vitamina C), é um importante metabólito celular que desempenha papel de fundamental importância na detoxificação das EROs, funcionando como antioxidante (Parvez & Raisuddin, 2005). É um nutriente hidrossolúvel indispensável para manter os processos fisiológicos de certos animais, incluindo a maioria dos peixes (Wang *et al.*, 2003). Age diretamente sobre as EROs e está envolvido na regeneração da Vitamina E (Chan, 1993). O ácido ascórbico interage com as EROs antes que possam agir oxidativamente sobre lipídios e proteínas (Nordberg & Arner, 2001).

A exposição e os efeitos de agroquímicos em organismos vivos podem ser estudados através dos biomarcadores. Atualmente, os organismos aquáticos estão continuamente sendo expostos a diversos contaminantes químicos e por isso efeitos adversos podem surgir como resposta aos diferentes mecanismos de toxicidade destes produtos (Barata *et al.*, 2005).

2.6 PRODUTOS DE ORIGEM APÍCOLA

A apicultura caracteriza-se pela exploração econômica e racional da abelha do gênero *Apis* e espécie *Apis mellifera*. Sua introdução no Brasil data de 1939 (Camargo, 1972). Estudos recentes vêm demonstrando as propriedades antioxidantes de produtos produzidos pelas abelhas *Apis mellifera*, que podem ser atribuídos ao alto teor de substâncias fenólicas encontrados nestes compostos que podem atuar como antioxidantes. Estes produtos são considerados importantes fontes de polifenóis, como os flavonoides e outros. Substâncias essas que agem como antioxidantes e removedores de radicais livres. A potência antioxidante

destes produtos pode variar de acordo com a proporção de cada substância ativa que por sua vez pode variar de acordo com a região onde o pólen foi coletado (Morse, 1990; Angelo & George, 2007; Carpes *et al.*, 2008; Viuda-Martos *et al.*, 2008; Nakajima *et al.*, 2009; Neves *et al.* 2009).

Os compostos fenólicos vegetais enquadram-se em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas. Dentre essas diversas classes, os compostos fenólicos têm recebido maior atenção por inibirem a peroxidação lipídica (Sousa *et al.*, 2007).

As substâncias fenólicas ou polifenóis são um dos mais importantes grupos de substâncias que ocorre nas plantas e que contribuem para as propriedades antioxidantes e sensoriais (cor, aroma, adstringência) de frutas, mel, bebidas e vegetais. Essas substâncias são fruto do metabolismo secundário das plantas, isto é, produtos que não apresentam uma função direta nas atividades bioquímicas primárias, responsáveis pelo crescimento, desenvolvimento e reprodução, mas estão envolvidos na adaptação a condições de estresse ambientais, seja contra a radiação ultravioleta ou agressão por patógenos (Moure *et al.*, 2001).

2.6.1 MEL

Na legislação brasileira (Instrução Normativa nº 11, 20.10.2000), “entende-se por mel o produto alimentício produzido pelas abelhas melíferas a partir do néctar das flores ou das secreções procedentes de partes vivas das plantas ou secreções de insetos sugadores de plantas que ficam sobre partes vivas de plantas, que as abelhas recolhem, transformam, combinam com substâncias específicas próprias, armazenam e deixam maturar nos favos da colmeia” (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA). Juntamente com o mel, as abelhas produzem outros importantes produtos como a própolis e o pólen apícola.

O mel tem sido reportado por conter cerca de 200 substâncias (mistura complexa de açúcares, mas também pequenas quantidades de outros constituintes tais como minerais, proteínas, vitaminas, ácidos orgânicos, flavonoides, ácidos fenólicos, enzimas e outros fitoquímicos), e é considerado uma importante parte da medicina tradicional (White, 1979). Serve também como fonte de antioxidantes, o qual executa um importante papel na preservação dos alimentos e na saúde humana combatendo os danos causados pelos agentes

oxidantes, por exemplo, oxigênio e diferentes processos inflamatórios, reduzindo o declínio do sistema de imunização, diferentes processos inflamatórios, etc. (The national honey board, 2003). Quanto ao estado físico os méis podem ser classificados em líquido, semi-granulado, granulado (cristalizado) e em favos.

2.6.2 PRÓPOLIS

Própolis é o nome genérico dado a uma substância resinosa coletada das abelhas, e usada na medicina popular com vários objetivos. Em sua composição existem mais de 300 substâncias, incluindo polifenóis e aminoácidos. A possível atividade antioxidante esta relacionada ao efeito de remoção de radicais livres. A própolis é utilizada pelas abelhas para duas finalidades principais: vedar a colmeia de maneira a não entrar água, vento ou outro animal; e serve também para mumificar outros insetos que penetrem na colmeia e são eventualmente mortos (Sousa *et al.*, 2007).

Várias substâncias presentes na própolis provêm de flores, ramos, brotos, exsudatos e de outras partes do tecido vegetal. Estas substâncias podem ainda ser modificadas na colmeia pela adição de secreções salivares (Santos *et al.*, 2003). Além disso, este produto apícola, possuiu propriedades bactericidas (Muñoz *et al.*, 2007).

A própolis possui enorme importância medicinal e econômica, sendo comercializada em várias preparações farmacêuticas e cosméticas, tais como: comprimidos, pastilhas, dentifrícios, loções, cremes faciais, tinturas, pomadas, etc. (Bankova *et al.*, 2000).

2.6.3 PÓLEN APÍCOLA

Segundo a Normativa n.º 03 de 19 de Janeiro de 2001 do Ministério de Agricultura e do Abastecimento (Brasil, 2001), pólen apícola é o resultado da aglutinação do pólen das flores, efetuada pelas abelhas operárias, mediante néctar e suas substâncias salivares. No final da coleta encontram-se reunidas as bolotas de grãos de coloração variável, indicando as diversas comunidades botânicas colecionadas pelas abelhas, formando uma mistura conhecida

por “mix” polínico, sendo esse material removido pelo apicultor para o beneficiamento, comercialização e consumo animal e humano.

Sua composição nutricional consiste de proteínas, lipídios, açúcares, fibras, sais minerais (cálcio, cloro, cobre, ferro, magnésio, iodo, molibdênio, selênio, estrôncio, estanho, boro, flúor, vanádio, cromo, fósforo, potássio, enxofre, alumínio, ferro, manganês, e zinco), aminoácidos e vitaminas (A, B, C, D,E) (Wesh & Marston, 1983; Marchini *et al.*, 2006).

Além disso, o pólen também contém altos teores de substâncias polifenólicas, principalmente flavonoides com atividade antioxidante (Campos *et al.*, 2003; Kroyer & Hegedus, 2001) e antimicrobiana (Basim *et al.*, 2006; García *et al.*, 2001).

2.6.4 GELEIA REAL

Geleia Real é uma substância gelatinosa de cor creme com reflexos nacarados, segregada pelas glândulas hipofaríngeas das abelhas operárias jovens, de sabor “*sui-generis*”, mas não ruim. É a única substância de alimento da colmeia, inclusive da abelha rainha por todo seu ciclo de vida. A fertilidade e o longo período de vida da rainha, que é alimentada exclusivamente com geleia real, têm sido alvo de interesse acreditando-se que a geleia real produza efeitos similares em seres humanos (Puttkammer,1994).

É constituído por vitaminas do complexo B, como inositol (B7), biotina (B8), ácido fólico (B9), alta concentração de ácido pantotênico (B5), piridoxina (B6), também sais minerais como cálcio, cobre, ferro, potássio e fósforo; bem como outros elementos vitais indispensáveis ao organismo humano. Apresenta vitaminas do complexo B, com destaque à vitamina B5, apresentando propriedades antioxidantes que retardam os processos de envelhecimento celular (Puttkammer,1994).

A ação conjugal de todos os elementos encontrados na geleia real combate outros fatores secundários no processo de envelhecimento, como radicais livres e o stress (Ferreira *et al.*, 2012), regenerando as células e contribuindo para o bom funcionamento de todos os órgãos do corpo e para um perfeito equilíbrio orgânico.

2.7 PRODUTOS DE ORIGEM APÍCOLA E SUA IMPORTÂNCIA NOS PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO

Vários estudos têm demonstrado as propriedades antioxidantes de produtos produzidos pelas abelhas *Apis mellifera*, que podem ser atribuídos ao alto teor de substâncias fenólicas encontrados nestes compostos que podem atuar como antioxidantes. O potencial antioxidante destes produtos pode variar de acordo com a proporção de cada substância ativa, que por sua vez pode variar de acordo com a região onde o pólen foi coletado (Angelo & George, 2007; Carpes *et al.*, 2008; Viuda-Martos *et al.*, 2008; Nakajima *et al.*, 2009; Neves *et al.* 2009).

O Censo Agropecuário de 1995/96 apontou a existência de 172.488 estabelecimentos agropecuários que desenvolvem a atividade apícola no Brasil, com 1,6 milhão de colmeias e produção de 18.450 toneladas de mel. Segundo estudos, estima-se que a apicultura brasileira conte com 300 mil apicultores, manejando 2,5 milhões de colmeias e produzindo de 30 a 40 mil toneladas de mel (Sommer, 2002).

O Brasil tem um grande potencial apícola devido à sua flora ser bastante diversificada, por sua extensão territorial e pela variabilidade climática existente, possibilitando assim produzir mel o ano todo, o que o diferencia dos demais países que, normalmente, colhem mel uma vez por ano. Atualmente o interesse no estudo dos compostos fenólicos tem aumentado muito, devido principalmente à habilidade antioxidante destas substâncias em sequestrar radicais livres, os quais são prejudiciais à saúde humana (Dorman *et al.*, 2003).

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

O presente projeto tem por objetivo geral verificar se produtos apícolas com potencial antioxidante relatado na literatura científica exercem estes efeitos antioxidantes quando administrados na água de cultivo de peixes expostos a tebuconazole, gerando uma tecnologia de proteção destes frente aos efeitos pró-oxidantes deste defensivo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Verificar o potencial antioxidante do mel em diferentes concentrações adicionadas a água de cultivo frente aos efeitos do tebuconazole em jundiás, determinando a menor concentração efetiva;
2. Verificar o potencial antioxidante do pólen apícola em diferentes concentrações adicionadas a água de cultivo frente aos efeitos do tebuconazole em jundiás, determinando a menor concentração efetiva;
3. Verificar o potencial antioxidante do extrato aquoso de própolis em diferentes concentrações adicionadas a água de cultivo frente aos efeitos do tebuconazole em jundiás, determinando a menor concentração efetiva;
4. Verificar o potencial antioxidante do extrato aquoso de geleia real em diferentes concentrações adicionadas a água de cultivo frente aos efeitos do tebuconazole em jundiás, determinando a menor concentração efetiva;
5. Determinar se a adição de produtos apícolas à água de cultivo tem potencial para tornar-se uma tecnologia de proteção aos peixes frente aos desafios pró-oxidantes provocados pela exposição a tebuconazole.

4. ASPECTOS AMBIENTAIS

Uma vez que o trabalho foi desenvolvido fazendo uso de agroquímico, tomou-se o cuidado com o descarte da água experimentalmente contaminada, que conforme descrito por Kreutz *et al.* (2008) permanecerá por um período de, pelo menos, 30 dias em tanques externos de fibra de vidro e depois percolada em sumidouro. Da mesma forma, todo o cuidado foi tomado com o descarte dos peixes mortos e abatidos durante o presente projeto, que foram congelados e descartados em coletores de lixo biológico, que são recolhidos por empresa

especializada juntamente ao lixo hospitalar proveniente do Hospital Veterinário da Universidade de Passo Fundo.

4.1 TEMPO DE EXPOSIÇÃO

No presente projeto o foco se deu através da continuidade e aprofundamento das pesquisas em exposições agudas aos defensivos. O tempo considerado como “exposição aguda” foi de 96 horas conforme recomenda a norma da academia brasileira de normas técnicas (ABNT), NBR 15088:2004, para testes de toxicidade aguda com peixes.

4.2 PRODUTOS TESTADOS

Com base nos resultados prévios de nosso grupo de pesquisa (Ferreira *et al.*, 2010) utilizou-se o fungicida tebuconazole que demonstrou forte potencial oxidativo na concentração de 0,88mg/L, o que equivale a 16,6% da CI50 (comercialmente adquirido).

Os produtos apícolas, mel, própolis, pólen, geleia real e pólen apícola foram obtidos do setor de apicultura do Centro em Pesquisas Agrônômicas da Universidade de Passo Fundo (CEPAGRO).

5. PRINCIPAIS CONTRIBUIÇÕES CIENTÍFICAS, TECNOLÓGICAS E DE INOVAÇÃO.

As contribuições científicas geradas no presente trabalho relacionam-se a capacidade antioxidante de produtos apícolas, a fim de evitar ou reverter os efeitos oxidativos causados pela exposição de peixes a diferentes agroquímicos. Fazendo uso de uma alternativa de baixo custo e com pouca geração de resíduos no meio ambiente. Podendo gerar uma tecnologia de cultivo de peixes importante para regiões / áreas de alto grau de contaminação agrícola. Esta possível tecnologia se caracteriza numa importante inovação para a piscicultura associada à agricultura, modelo muito comum na região sul do Brasil, em especial no Rio Grande do Sul.

6. RESULTADOS

6.1 Antioxidant activity of bee products added to water in tebuconazole-exposed fish.

Daiane Ferreira, Taís Cristina Unfer, Hélio Carlos Rocha, Luiz Carlos Kreutz, Gessi Koakoski and Leonardo José Gil Barcellos

Artigo publicado na revista: *Neotropical Ichthyology*, 10(1): 215-220, 2012
Copyright © 2012 Sociedade Brasileira de Ictiologia

Antioxidant activity of bee products added to water in tebuconazole-exposed fish

Daiane Ferreira¹, Taís Cristina Unfer¹, Hélio Carlos Rocha², Luiz Carlos Kreutz², Gessi Koakoski¹ and Leonardo José Gil Barcellos²

An experiment was conducted to evaluate the potential of honey, propolis, and bee pollen for the reversal of lipid peroxidation induced by tebuconazole (TEB) in South American catfish (*Rhamdia quelen*), in which the concentration of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), the activity of the antioxidant enzyme glutathione-S-transferase (GST) and the concentrations of non-enzymatic antioxidants, reduced glutathione (GSH), ascorbic acid, and non-protein thiols were assessed. Honey (0.125 g L⁻¹) and bee pollen (0.05 g L⁻¹) added to the water reverse the production of TBARS induced by TEB, while propolis demonstrated a pro-oxidant effect, inducing an increase in TBARS production. The data presented herein suggest that the addition of water to honey and bee pollen potentially protects against the oxidative stress caused by agrichemicals.

Um experimento foi conduzido objetivando avaliar o potencial do mel, da própolis e do pólen apícola na reversão da peroxidação lipídica causada pelo fungicida tebuconazole (TEB) na espécie de peixe tropical *Rhamdia quelen*, avaliando a concentração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), a atividade da enzima glutathione-S-transferase (GST) e das concentrações dos antioxidantes glutathione reduzida (GSH), ácido ascórbico e dos tiois não proteicos. O mel adicionado à água na concentração de 0,125 g L⁻¹ e o pólen apícola na concentração de 0.05 g L⁻¹ revertem a geração das TBARS causada pela exposição ao TEB, enquanto a própolis demonstrou efeito pró-oxidante, induzindo um aumento na geração das TBARS. Os dados apresentados neste trabalho sugerem o potencial do mel e do pólen apícola adicionados à água como substâncias protetoras contra o estresse oxidativo causado por agroquímicos.

Key words: Antioxidants, Bee pollen, Honey, Lipid peroxidation, Propolis, Tebuconazole.

Introduction

Because of the close proximity of agricultural crops to fish farms, some pesticides can reach fish facilities and cause lipid peroxidation with consequent cell damage and loss of function (Ferreira *et al.*, 2010). In this respect, the search for natural antioxidants is justified.

Tebuconazole (TEB) is a potent fungicide that induces oxidative stress in *Rhamdia quelen* (Ferreira *et al.*, 2010), and its use in agriculture is a source of contaminants to the water used in fish farms. This molecule is an active ingredient used in plant cultures or as wood preservative (Lebokowska *et al.*, 2003), which degrades with short persistence in the environment, and is not bioaccumulative (Milenia[®], Brazil).

Oxidative stress occurs when the balance between pro-oxidants and antioxidants is disrupted in favor of the former.

The antioxidant system comprises a group of low molecular weight compounds such as ascorbic acid and reduced glutathione (GSH), one of the most important components in the antioxidant defense of cells (Storey, 1996). Glutathione-S-transferase (GST) is a phase II detoxification enzyme, which catalyzes the conjugation of GSH with a variety of electrophilic compounds. Besides its role as a substrate, GSH acts with a mild reactive oxygen species (ROS), contributing directly to the control of the redox state (Ferreira *et al.*, 2010).

Recent studies have shown intensive research on bee by-products (*e.g.*, honey, bee pollen, and propolis), whose antioxidant properties can be attributed to their content of phenolic substances such as flavonoids (Morse, 1990; Angelo & George, 2007; Viuda-Martos *et al.*, 2008; Nakajima *et al.*, 2009). Thus, the aim of the present study was to determine the

¹Universidade Federal de Santa Maria, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Faixa de Camobi, Km 9, Câmpus Universitário, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil.

²Universidade de Passo Fundo, Curso de Medicina Veterinária, Câmpus Universitário do Bairro São José, Caixa Postal 611, 99001-970 Passo Fundo, RS, Brazil. lbarcellos@upf.br (LJGB)

antioxidant potential of these bee products, as a counterbalance to the oxidant effect of TEB on *R. quelen*.

Material and Methods

The experiment was conducted from November to December 2009 in the facilities of Universidade de Passo Fundo, Brazil. Six-month-old juvenile male and female South American catfish, weighing, on average, 115.7 ± 23.3 g (SEM) were used. The fish were distributed in the experimental tanks, exposed to natural photoperiod, and fed twice daily (at 10:00 a.m. and 4:00 p.m.) with commercial extruded feed, 5% of their body weight, prior to the beginning of the experimental period. The water temperature (26 ± 1 °C) and dissolved oxygen concentrations (5.6 to 7.5 mg L⁻¹) were measured with a YSI model 550 oxygen meter (Yellow Spring Instruments, USA). The pH values (6.6 to 7.0) (Bernauer pH meter), total ammonia, N (< 0.5 mg L⁻¹), total alkalinity (60 mg L⁻¹), and hardness (65 mg L⁻¹) were also measured (all using colorimetric tests).

Experimental design. The experiment was conducted in 24 tanks with 200 L of water (eight experimental groups with three replicates each). The first group was the control, without any contamination. The second group consisted of artificial contamination with 0.88 mg L⁻¹ of TEB (CETM Folicur 200). The third group was characterized by the addition of 0.125 g L⁻¹ of honey (H); the fourth group consisted of TEB contamination plus honey. The fifth group received bee pollen (BP) at a concentration of 0.05 g L⁻¹. The sixth group consisted of TEB contamination plus bee pollen. The seventh group was given 0.01 g L⁻¹ of propolis (PP) and the eighth group was submitted to TEB contamination plus propolis.

The TEB concentration was established based on previous works (Cericato *et al.*, 2008; Kreutz *et al.*, 2008). Because studies using honey, bee pollen, or propolis directly added to water were not found, the concentrations of bee products used in these experiments were arbitrarily determined.

Fish (10 per tank) were kept under these conditions for 96 hours, being fed daily at a rate of 0.75% of their biomass. At the end of this period, samples (kidney, liver, and brain) were collected for specific measurements.

Chemicals and honeybee by-product. The agrichemical used (tebuconazole) was obtained commercially. 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), bovine serum albumin, Triton X100, hydrogen peroxide (H₂O₂), malondialdehyde (MDA), 2-thiobarbituric acid (TBA), and sodium dodecyl sulfate (SDS) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Honey, propolis, and bee pollen used in this experiment were produced at Centro de Pesquisa Agropecuária (CEPAGRO) at Universidade de Passo Fundo, Brazil.

Sampling. The fish were anesthetized by the addition of buffer (NaH₂CO₃) MS222 (300 mg/l) in the tanks. After loss of orientation and complete immobilization, the fish were caught, killed by decapitation and spinal section, and immediately

dissected for the collection of tissue samples. The liver, kidney, and brain were immediately frozen in liquid nitrogen and stored for further analyses.

Parameters evaluated

Protein determination. The protein levels were estimated spectrophotometrically by the method of Bradford (1976) using bovine serum albumin as standard.

Oxidative stress parameters. Thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) levels: The peroxides produced can be indirectly quantified by a TBARS assay, which is believed to reflect the intensity of lipid peroxidation by quantifying one of its main end products - malondialdehyde (Lushchak *et al.*, 2009). This is performed by a malondialdehyde (MDA) reaction with 2-thiobarbituric acid (TBA), which is optically measured. Tissue samples were homogenized with 10% trichloroacetic acid (TCA) using a motor-driven Teflon pestle and centrifuged at 1,000g for 10 min. Liver homogenates (100–400 µL) were added to 8.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 2.5 M acetic acid (pH 3.4), and 0.8% thiobarbituric acid; the final volume was adjusted to 2.0 mL. The reaction mixture was placed in a microcentrifuge tube and incubated for 90 min at 95 °C. After cooling, it was centrifuged at 5,000g for 10 min, and optical density was determined at 532 nm. TBARS levels were expressed as nmol MDA per mg of protein, according to Ohkawa *et al.* (1979). Butylated hydroxytoluene (BHT) was added to the samples before storage to control for further artifactual lipid peroxidation.

Enzymatic defense against xenobiotics. Catalase assay: Catalase (CAT; EC 1.11.1.6) activity was assayed by ultraviolet spectrophotometry (Nelson & Kiesow, 1972). Liver samples were homogenized in a Potter-Elvehjem glass/Teflon homogenizer with 20 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4 (with 0.1% Triton X-100 and 150 mM NaCl) (1:20 dilution), centrifuged at 10 000g for 10 min at 4°C. Briefly, the assay mixture consisted of 2.0 mL potassium phosphate buffer (50 mM, pH 7.0), 0.05 mL H₂O₂ (0.3 M), and 0.05 mL homogenate. Changes in H₂O₂ absorbance in 60 s were measured at 240 nm. Catalase activity was calculated in terms of µmol mg⁻¹ of protein min⁻¹.

Glutathione-S-transferase: The glutathione S-transferase (GST) activity was determined using the method of Habig *et al.* (1974). The reaction mixture consisted of 33 mM Hepes buffer (pH 7.5), 1.5 mM GSH, 1.5 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), and water in a total volume of 1 mL. The conjugation of GSH with CDNB via GST activity was recorded spectrophotometrically at 340 nm during 3 min. The activity was expressed as nmol of CDNB conjugate formed min⁻¹ mg⁻¹ protein.

Non-enzymatic antioxidants. Ascorbic acid: Ascorbic acid in the brain and liver was determined at 524 nm. Briefly, brain and liver samples were homogenized (1:10 w/v) in 20% TCA and centrifuged at 11 300g for 3 min. Samples (250 µL) of the

supernatant were mixed with 250 μL of water plus 25 μL of 0.02% 2,6-dichlorophenolindophenol and incubated for 1 h at room temperature. After that, 250 μL of 2% thiourea and 5% metaphosphoric acid solution plus 250 μL of 0.2% dinitrophenylhydrazine in 12 M sulfuric acid were added. The reaction tubes were incubated in a water bath at 60°C for 3 h. Following the incubation, 500 μL of 18 M sulfuric acid was added, and the tubes were centrifuged at 500g for 10 min. The absorbance was read, compared to a standard containing 100 nmol of ascorbic acid, and expressed in $\mu\text{mol g}^{-1}$ of tissue (Carr *et al.*, 1983).

Non-protein thiols: Non-protein thiol levels were determined in the liver by the method of Ellman *et al.* (1961). Tissue (100 mg) was precipitated with Tris HCl 50 mM (pH 7.5), followed by centrifugation at 3,000g for 10 min. An aliquot of the supernatants (1.0 mL) mixed with 10% TCA was centrifuged and then a new aliquot of this supernatant (400 μL) was used for determination with 10 mM of 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), 0.5 mM phosphate buffer (pH 6.8), 0.5 mM cysteine, and the reaction was followed at 412 nm. Non-protein thiol levels were expressed as $\mu\text{mol SH g}^{-1}$ of liver.

Reduced glutathione (GSH): GSH levels were determined by the method of Ellman (1959). Supernatants (0.25 mL) were used for determination with 5,50-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) 10 mM (DTNB) (0.05 mL) and phosphate buffer 0.5 mM (pH 6.8) (0.7 mL). The optical density of reaction product was read at 412 nm on a spectrophotometer, and results were expressed as $\mu\text{mol GSH g}^{-1}$ of wet tissue.

Statistics. The mean \pm SEM of each group was calculated, and ANOVA followed by Dunnett's test was used to compare each value against the control value using the GraphPad InStat 3.00 statistical package (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Statistical significance was accepted at $p < 0.05$. Hartley's test was carried out to verify the homogeneity of variance, and normality was tested using the Kolmogorov-Smirnov test.

Results and Discussion

The determination of TBARS levels has often been used as a biomarker of toxic pollutants in fish (Livingstone, 2001; Crestani *et al.*, 2007; Gluszcak *et al.*, 2007). In the present study, we observed that the exposure of South American catfish (*Rhamdia quelen*) to TEB caused oxidative damage to lipids, characterized by an increase in the lipid peroxidation of the analyzed tissues (Fig. 1). Earlier studies demonstrated that there was an increase in the oxidative stress in South American catfish (Ferreira *et al.* 2010) and carp (*Cyprinus carpio*) (Toni *et al.*, 2011) exposed to TEB for 96 h. Ahmad *et al.* (2004) reported that lipid peroxidation is one of the major processes induced by oxidative stress, observed in several fish species, resulting from exposure to xenobiotics such as pesticides, fungicides, and herbicides.

Glutathione is a tripeptide that is actively present in cells in its reduced form (GSH). One of the roles of GSH is the removal of free radicals, and this process acts as defense

against potentially harmful oxidant and xenobiotic molecules (Lee & Anderson, 2005). In TEB-exposed fish, we noticed an increase in GSH levels in all tissues (Fig. 1). Non-protein thiol (NPSH) levels increased only in the kidneys and brains of exposed animals (Table 1). It is widely known that most of the NPSH content is made up of GSH (Cnubben *et al.*, 2001). However, GSH and NPSH were measured separately in order to improve the reliability of the responses to TEB. As a matter of fact, we noted that GSH levels seemed to be more representative than antioxidant effects. Moreover, GSH undergoes oxidation after being conjugated in a redox process and is converted again to its reduced form in adaptive responses (Lee & Anderson, 2005). In addition, NPSH levels may be suppressed for being compromised in adaptive mechanisms of the redox system as a whole (Torres *et al.*, 2004; Lee & Anderson, 2005).

Glutathione-S-transferase (GST) activity increased significantly in the liver of *R. quelen* exposed to TEB (Table 1). This probably occurs because the liver is the metabolic center for detoxification and because GST catalyzes the GSH conjugation with xenobiotics to facilitate excretion, thus contributing to antioxidant defenses (Torres *et al.*, 2004).

Interestingly, we perceived that ascorbic acid (vitamin C) levels increased in the kidney and decreased in the brain of *R. quelen* in the presence of TEB (Table 1). Ascorbic acid turns reactive oxygen species (ROS) into harmless species, acting as an *in vivo* antioxidant and thus preventing chain auto-oxidation reactions (Toni *et al.*, 2011).

Honey is one of the most largely consumed bee products and is known for its curative properties. In our study, the exposure of *R. quelen* to honey did not alter TBARS levels in any of the analyzed tissues (Fig. 1). When honey was added to the water exposed to TEB, we observed that lipid peroxidation decreased in the liver and kidney, showing the capacity of honey to reverse the oxidative damage of TEB to lipids. Furthermore, GSH levels were high in South American catfish exposed to honey (Fig. 1). In TEB+H exposure, GSH levels dropped in all analyzed tissues. Our assumption is based on the likely participation of glutathione in the reversal of oxidative damage of the lipid peroxidative cascade (Lee & Anderson, 2005).

GST and ascorbic acid levels were inconclusive in our study, with no clear tendency, but the data indicate that bee products have an effect on these parameters. The liver is the metabolic center for detoxification and some authors suggest that changes are essential for the metabolism and excretion of toxic substances in fish (Hinton *et al.*, 2001; Crestani *et al.*, 2007; Cattaneo *et al.*, 2008; Melo *et al.*, 2008). Therefore, the presence of bee product extracts, despite the antioxidant potential observed in this study, could affect the same metabolic processes in the liver.

Bee pollen (BP), another bee product assessed in this study, did not change TBARS levels in the tissues of *R. quelen* when singly added to the water (Fig. 1). Nonetheless, when combined with TEB, BP reversed lipid peroxidation in the brain and kidney. GSH levels were low in all tissues of *R.*

Table 1. Glutathione-S-transferase, non protein thiols and ascorbic acid in *Rhamdia quelen* exposed to tebuconazole, honey, propolis or bee pollen and the combination of bee products and the fungicide. Different small letter after the means indicates significant difference, ANOVA followed by Tukey's multiple range test, $P < 0.05$, $n = 10$. Units: glutathione S-transferase, $\mu\text{mol GS-DNB min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$; reduced glutathione, $\mu\text{mol GSH g}^{-1}$ of wet tissue; non protein thiols, $\mu\text{mol SH g}^{-1}$ of tissue; ascorbic acid, $\mu\text{mol g}^{-1}$ of tissue. Different small letters indicates statistical differences between the means (ANOVA followed by Tukey's multiple range test)

	CONTROL	TEB	H	TEB+H	BP	TEB+BP	PP	TEB+PP
Kidney								
GST	0.52 ± 0.06^a	0.68 ± 0.08^a	0.58 ± 0.09^a	0.52 ± 0.11^a	0.25 ± 0.04^b	0.04 ± 0.01^c	0.53 ± 0.14^a	0.20 ± 0.03^b
Non protein thiols	0.43 ± 0.07^b	0.92 ± 0.08^a	0.48 ± 0.05^{ab}	0.80 ± 0.13^a	0.59 ± 0.15^{ab}	0.38 ± 0.06^b	0.85 ± 0.15^a	0.41 ± 0.06^b
Ascorbic Acid	1.75 ± 0.22^b	0.71 ± 0.06^c	2.12 ± 0.39^b	1.80 ± 0.28^b	8.55 ± 0.47^a	2.97 ± 0.13^b	1.02 ± 0.07^b	0.69 ± 0.07^c
Brain								
GST	0.62 ± 0.12^b	0.68 ± 0.09^{ab}	1.16 ± 0.11^a	0.99 ± 0.23^a	0.61 ± 0.06^b	0.55 ± 0.09^b	0.33 ± 0.05^b	1.00 ± 0.10^a
Non protein thiols	0.71 ± 0.03^b	1.02 ± 0.05^a	0.65 ± 0.08^b	0.51 ± 0.11^{bc}	0.40 ± 0.06^c	0.51 ± 0.09^{bc}	0.78 ± 0.13^b	0.57 ± 0.09^{bc}
Ascorbic Acid	0.59 ± 0.07^b	2.14 ± 0.19^a	0.51 ± 0.10^b	1.90 ± 0.27^a	1.47 ± 0.36^{ab}	2.70 ± 0.50^a	0.65 ± 0.05^b	1.55 ± 0.16^{ab}
Liver								
GST	0.39 ± 0.05^b	1.65 ± 0.29^a	1.00 ± 0.21^{ab}	2.23 ± 0.45^a	0.65 ± 0.07^{ab}	0.47 ± 0.13^b	2.05 ± 0.21^a	0.54 ± 0.11^b
Non protein thiols	0.94 ± 0.13^a	0.98 ± 0.06^a	1.07 ± 0.13^a	0.65 ± 0.11^{ab}	0.98 ± 0.19^a	0.48 ± 0.06^b	1.13 ± 0.06^a	0.89 ± 0.12^a
Ascorbic Acid	1.08 ± 0.07^c	2.24 ± 0.14^b	0.92 ± 0.16^c	1.76 ± 0.20^{bcd}	8.34 ± 0.36^a	2.64 ± 0.16^b	2.38 ± 0.24^b	0.76 ± 0.03^d

quelen exposed to TEB+BP, probably because GSH was used again for reversal of oxidative damage to lipids (Fig.1). Apparently, exposure to contaminants leads to rapid thiol depletion in several processes, such as peroxidation, conjugation, glutathiolation, and neutralization, and later, through adaptive responses, the exposure increases the levels of these compounds (Lee & Anderson, 2005).

We noted that ascorbic acid levels exposed to BP were higher than in controls, mainly in the liver and kidneys, probably indicating high metabolism of both organs compared to the relatively low kinetic parameters of the brain.

The higher antioxidant activity of BP is related to phenolic compounds, even though proteins and vitamins also can contribute to such activity (Leja, 2007). PP added to the water did not change TBARS levels in the analyzed tissues (Fig.1). Nevertheless, in the presence of TEB+PP, there was an increase in lipid peroxidation in the brain and liver. GSH levels were elevated in the kidneys and liver of *R. quelen* exposed to PP (Fig.1). However, we observed a decline in thiol levels when we added TEB+PP, which indicates oxidative stress induced by PP+TEB in these tissues, given that oxidative damage increased while antioxidant defenses lowered.

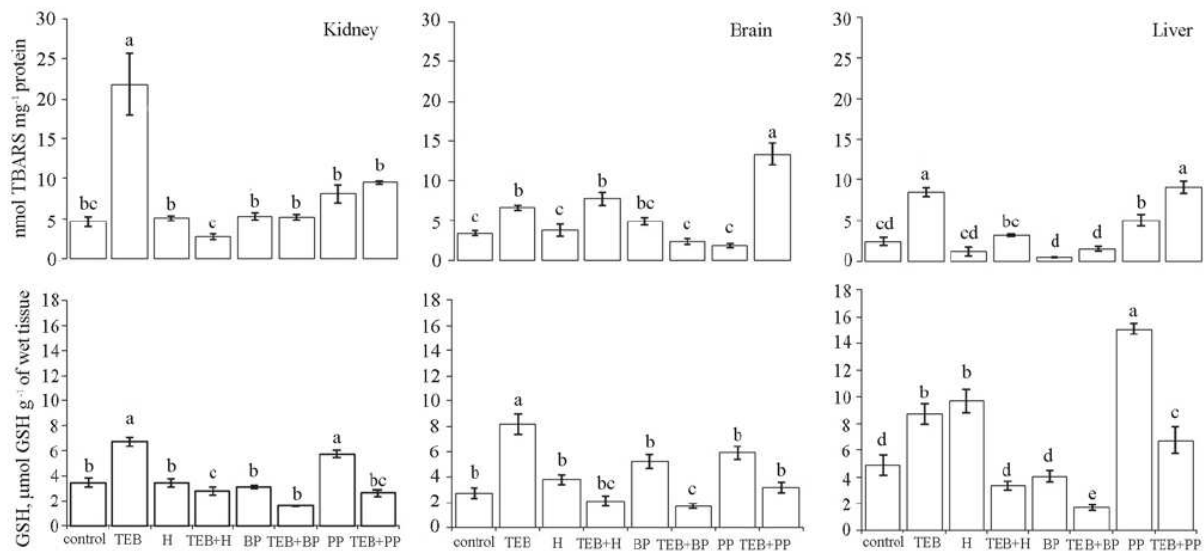


Fig. 1. Levels of TBARS (nmol MDA mg^{-1} protein) and GSH ($\mu\text{mol GSH g}^{-1}$ of wet tissue) in *Rhamdia quelen* after exposure to 16.6% of LC_{50} of tebuconazole, to bee product, and to tebuconazole + bee product for 96 h. Different small letters indicates statistical differences between the means (ANOVA followed by Tukey's multiple range test). Mean \pm SEM; $n = 10$. * $P \leq 0.05$.

Phenolic substances are the active compounds most commonly found in natural products (Rhodes, 1996). As natural antioxidants, they can play a crucial physiological role by minimizing oxidative damage to animal tissues (Sant'Ana & Mancini Filho, 1999; Melo & Guerra, 2002). Honey, as a source of antioxidants, has been reported to be efficient against oxidative processes (Chen *et al.*, 2000; McKibben & Engeseth, 2002). In addition to polyphenols, propolis contains a wide range of other compounds that are able to remove excess free radicals (Marquele *et al.*, 2005). The biological activity of honey and of its by-products is also related to its floral origin (Barth, 2004). Another important remark concerns the doses of bee products used. As we used a single dose, lower concentrations could produce similar effects.

In conclusion, the data clearly suggest the potential of honey and bee pollen as protective agents against the oxidative damage induced by tebuconazole. Our main assumption is that the major antioxidant mechanism of bee products, reducing the lipid peroxidation induced by TEB, is associated with the recycling of glutathione. Future studies should focus on some issues such as the differences between bee products of different botanical and climatic regions and the validation for the use of bee products as protective agents on a commercial scale, mainly in agricultural regions where pesticide contamination is common.

Literature Cited

- Ahmad, I., M. Pacheco & M. A. Santos. 2004. Enzymatic and enzymatic antioxidants as an adaptation to phagocytes induced damage in *Anguilla anguilla* L. following in situ harbor water exposure. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 57: 290-295.
- Ângelo, P. M. & N. Jorge. 2007. Compostos fenólicos em alimentos - Uma breve revisão. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 66: 232-240.
- Barth, O. M. 2004. Melissopalynology in Brazil: a review of pollen analysis of honeys, propolis and pollen loads of bees. *Scientia Agrícola*, 61: 342-350.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Carr, R. S., M. B. Bally, P. Thomas & J. M. Neff. 1983. Comparison of methods for determination of ascorbic acid in animal tissues. *Analytical Chemistry*, 55: 1229-1232.
- Cattaneo, R., V. L. Loro, R. Spanevello, F. A. Silveira, L. Luz, D. S. Miron, M. B. Fonseca, B. S. Moraes & B. Clasen. 2008. Metabolic and histological parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to commercial formulation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) herbicide. *Pesticide Biochemistry Physiology*, 92: 133-137.
- Cericato, L., J. G. M. Neto, M. Fagundes, L. C. Kreutz, R. M. Quevedo, J. Finco, J. G. S. Rosa, G. Koakoski, L. Centenaro, E. Pottker, D. Anziliero & L. J. G. Barcellos. 2008. Cortisol response to acute stress in jundiá *Rhamdia quelen* acutely exposed to sublethal concentrations of agrichemicals. *Comparative and Biochemistry Physiology part C*, 148: 281-286.
- Chen, L., A. Mehta, M. Berenbaum, A. R. Zangerl & N. J. Engeseth. 2000. Honey from different floral sources as inhibitors of enzymatic browning in fruit and vegetable homogenates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 4997-5000.
- Cnubben, N. H. P., I. M. C. M. Rietjens, H. Wortelboer, J. Zanden & P. J. Bladeren. 2001. The interplay of glutathione-released process in antioxidant defense. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 10: 141-152.
- Crestani, M., C. Menezes, L. Gluszczak, D. S. Miron, R. Spanevello, A. Silveira, F. F. Goncalves, R. Zanella & V. L. Loro. 2007. Effect of clomazone herbicide on biochemical and histological aspects of silver catfish (*Rhamdia quelen*) and recovery pattern. *Chemosphere*, 67: 2305-2311.
- Ellman, G. L. 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry*, 82: 70-77.
- Ellman, G. L., K. D. Courtney & V. Andres Jr. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemistry and Pharmacology*, 7: 88-95.
- Ferreira, D., A. C. Motta, L. C. Kreutz, C. Toni, V. L. Loro & L. J. G. Barcellos. 2010. Assessment of oxidative stress in *Rhamdia quelen* exposed to agrichemicals. *Chemosphere*, 79: 914-921.
- Gluszczak, L., D. S. Miron, B. S. Moraes, R. R. Simões, M. R. C. Schetinger, V. M. Morsch & V. L. Loro. 2007. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Comparative Biochemistry Physiology*, 146: 519-524.
- Habig, W. H., M. J. Pabst & W. B. Jacoby. 1974. Glutathione S-transferase, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biology and Chemistry*, 249: 7130-7139.
- Hinton, D. E., H. Segner & T. Braunbeck. 2001. Toxic responses of the liver. In: Daniel, S. & Benson, W. H. (Eds.), *Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts*, 1: 225-266.
- Kreutz, L. C., L. J. G. Barcellos, T. O. Silva, D. Anziliero, D. Martins, M. Lorenson, A. Marteninghe & L. B. Silva. 2008. Acute toxicity testing of agricultural pesticides on silver catfish (*Rhamdia quelen*), fingerlings. *Ciência Rural*, 38: 1050-1055.
- Lebokowska, M., M. Z. Radziwill, A. R. Narozniak & S. Kobiela. 2003. Toxicity assessment of wood preservatives. *Environmental International*, 28: 801-802.
- Lee, R. F. & J. W. Anderson. 2005. Significance of cytochrome P450 system responses and levels of bile fluorescent aromatic compounds in marine wildlife following oil spills. *Marine Pollution Bulletin*, 50: 705-723.
- Leja, M., A. Mareczek, G. Wyzgolik, J. Klepacz-Baniak & K. Czekonska. 2007. *Food Chemistry*, 100: 237-240.
- Livingstone, D. R. 2001. Contaminant-stimulated Reactive Oxygen Species Production and Oxidative Damage in Aquatic Organisms. *Marine Pollution Bulletin*, 42: 656-666.
- Lushchak, O. V., O. I. Kubrak, J. M. Storey, K. B. Storey & V. I. Lushchak. 2009. Low toxic herbicide roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. *Chemosphere*, 76: 932-937.
- Marquele, F. D. I., V. M. Mambro, S. R. Georgetti, R. Casagrande, Y. M. Valim & M. J. Fonseca. 2005. Assessment of the antioxidant activities of Brazilian extracts of propolis alone and in topical pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 39: 455-462.
- McKibben, J. & Engeseth, N. J. 2002. Honey as a protective agent against lipid oxidation in ground turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 592-595.
- Melo, G. C., L. Donatti, C. A. M. Rudniki & E. Fanta. 2008. Hepatic alterations in the fish *Rhamdia quelen* contaminated with Folidol 600. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 71: 821-829.
- Melo, E. A. & N. B. Guerra. 2002. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciências e Tecnologia de Alimentos*, 36: 1-11.

- Milenia Agrociências S.A. <http://www.milenia.com.br>, available online. Downloaded at May 2008.
- Morse, R. A. 1990. ABC and XYZ of Bee Culture. Santo Antonio: A. I. Root Company, 516p.
- Nakajima, Y., K. Tsuruma, M. Shimazawa, S. Mishima & H. Hara. 2009. Comparison of bee products based on assays of antioxidant capacities. BMC Complementary and Alternative Medicine, 9: 4.
- Nelson, D. P. & L. A. Kiesow. 1972. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solution in the UV). Analytical Biochemistry, 49: 474-478.
- Ohkawa, H., N. Ohishi & K. Yagi. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Analytical Biochemistry, 95: 351-358.
- Rhodes, M. J. C. 1996. Physiologically-active compounds in plant food: an overview. Proceedings of the Nutrition Society, 55: 371-384.
- Sant'Ana, L. S. & J. Mancini Filho. 1999. Ação Antioxidante de extratos de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) em filés de peixe da espécie pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg). Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, 2: 27-31.
- Storey, K. B. 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 29: 1715-1733.
- Toni, C., D. Ferreira, L. C. Kreutz, V. L. Loro & L. J. G. Barcellos. 2011. Assessment of oxidative stress and metabolic changes in common carp (*Cyprinus carpio*) acutely exposed to different concentrations of the fungicide tebuconazole. Chemosphere, 83: 579-584.
- Torres, M. C. L., N. F. F. Soares & J. F. Maia. 2004. Parâmetros cinéticos da glutatona s-transferase e sua ativação por extratos de vegetais. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 24: 243-248.
- Viuda-Martos, M., Y. Ruiz-Navajas, J. Fernández-López & J. A. Pérez-Álvarez. 2008. Functional Properties of Honey, Propolis, and Royal Jelly. Journal of Food Sciences, 73: R117-R124.

Submitted June 29, 2011
 Accepted October 17, 2011
 Published March 30, 2012

6.2 Bee Products Prevent Agrichemical-Induced Oxidative Damage in Fish.

Daiane Ferreira, Helio Carlos Rocha, Luiz Carlos Kreutz, Vania Lucia Loro, Alessandra Marqueze, Gessi Koakoski, João Gabriel Santos da Rosa, Darlan Gusso, Thiago Acosta Oliveira, Murilo Sander de Abreu, Leonardo José Gil Barcellos

Artigo publicado na revista: Plos One. October 2013 | Volume 8 | Issue 10 | e74499

Bee Products Prevent Agrichemical-Induced Oxidative Damage in Fish

Daiane Ferreira¹, Helio Carlos Rocha², Luiz Carlos Kreutz², Vania Lucia Loro³, Alessandra Marqueze⁴, Gessi Koakoski¹, João Gabriel Santos da Rosa¹, Darlan Gusso¹, Thiago Acosta Oliveira¹, Murilo Sander de Abreu¹, Leonardo José Gil Barcellos^{2*}

1 Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil, **2** Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, Universidade de Passo Fundo (UPF), Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brazil, **3** Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil, **4** Programa de Pós-Graduação em Avaliação de Impactos Ambientais, Centro Universitário La Salle (Unilasalle), Canoas, Rio Grande do Sul, Brazil

Abstract

In southern South America and other parts of the world, aquaculture is an activity that complements agriculture. Small amounts of agrichemicals can reach aquaculture ponds, which results in numerous problems caused by oxidative stress in non-target organisms. Substances that can prevent or reverse agrichemical-induced oxidative damage may be used to combat these effects. This study includes four experiments. In each experiment, 96 mixed-sex, 6-month-old *Rhamdia quelen* (118±15 g) were distributed into eight experimental groups: a control group that was not exposed to contaminated water, three groups that were exposed to various concentrations of bee products, three groups that were exposed to various concentrations of bee products plus tebuconazole (TEB; Folicur 200 CE™) and a group that was exposed to 0.88 mg L⁻¹ of TEB alone (corresponding to 16.6% of the 96-h LC₅₀). We show that waterborne bee products, including royal jelly (RJ), honey (H), bee pollen (BP) and propolis (P), reversed the oxidative damage caused by exposure to TEB. These effects were likely caused by the high polyphenol contents of these bee-derived compounds. The most likely mechanism of action for the protective effects of bee products against tissue oxidation and the resultant damage is that the enzymatic activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione-S-transferase (GST) are increased.

Citation: Ferreira D, Rocha HC, Kreutz LC, Loro VL, Marqueze A, et al. (2013) Bee Products Prevent Agrichemical-Induced Oxidative Damage in Fish. PLoS ONE 8(10): e74499. doi:10.1371/journal.pone.0074499

Editor: Jose Luis Balcazar, Catalan Institute for Water Research (ICRA), Spain

Received: April 18, 2013; **Accepted:** August 2, 2013; **Published:** October 3, 2013

Copyright: © 2013 Ferreira et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The authors have no support or funding to report.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: lbarcellos@upf.br

Introduction

In southern South America and other parts of the world, aquaculture is still considered a complementary activity to agriculture. In agricultural, fish cultures are often located in close proximity to agricultural areas and are fed by water from springs that run through cultivated soil. Consequently, small amounts of agrichemicals can reach aquaculture ponds [1], leading to the exposure of non-target organisms to numerous problems, such as oxidative stress.

Oxidative stress refers to a disturbance in the balance between oxidants and antioxidants, which favors an abundance of oxidants [2]. To maintain oxidative balance, organisms utilize an enzymatic antioxidant defense system that is comprised of enzymes, such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione-S-transferase (GST), as well as a nonenzymatic defense system comprised of ascorbic acid (AsA), total thiols (TT) and other components [2,3]. When these systems fail to maintain the oxidative balance, pro-oxidants may induce higher lipid peroxidation (LPO) ratios and cause damage to tissues and cells [4].

Most agricultural models utilize agrichemicals intensely during crop production; therefore, substances that can prevent or reverse agrichemical-induced oxidative damage are beneficial. Bee prod-

ucts are a good option because they are important sources of polyphenols [5–9], which are known to be antioxidants and free radical scavengers.

Recently, the antioxidant properties of natural products have been intensively researched to find economically viable substances with low environmental impact. Antioxidants inhibit the reactive oxygen species (ROS) generated by cellular metabolism, which has fueled the analysis of various antioxidant compounds as isolated products and *in natura* [10].

In a previous study, we found that honey (H) and bee pollen (BP) reversed agrichemical-induced oxidative stress, whereas the alcoholic extract of propolis (P) induced a protracted oxidative reaction [11]. In that study, we used bee products at a unique arbitrary concentration and did not test royal jelly (RJ).

In this study, we investigated different waterborne concentrations of H, BP, water extract of P and RJ as protectants against the damaging effects caused by exposing fish to the fungicide tebuconazole (TEB).

Materials and Methods

In the following experiments, which were repeated for each bee product, we assayed three concentrations of each product to determine the lowest active concentration. The experiments were

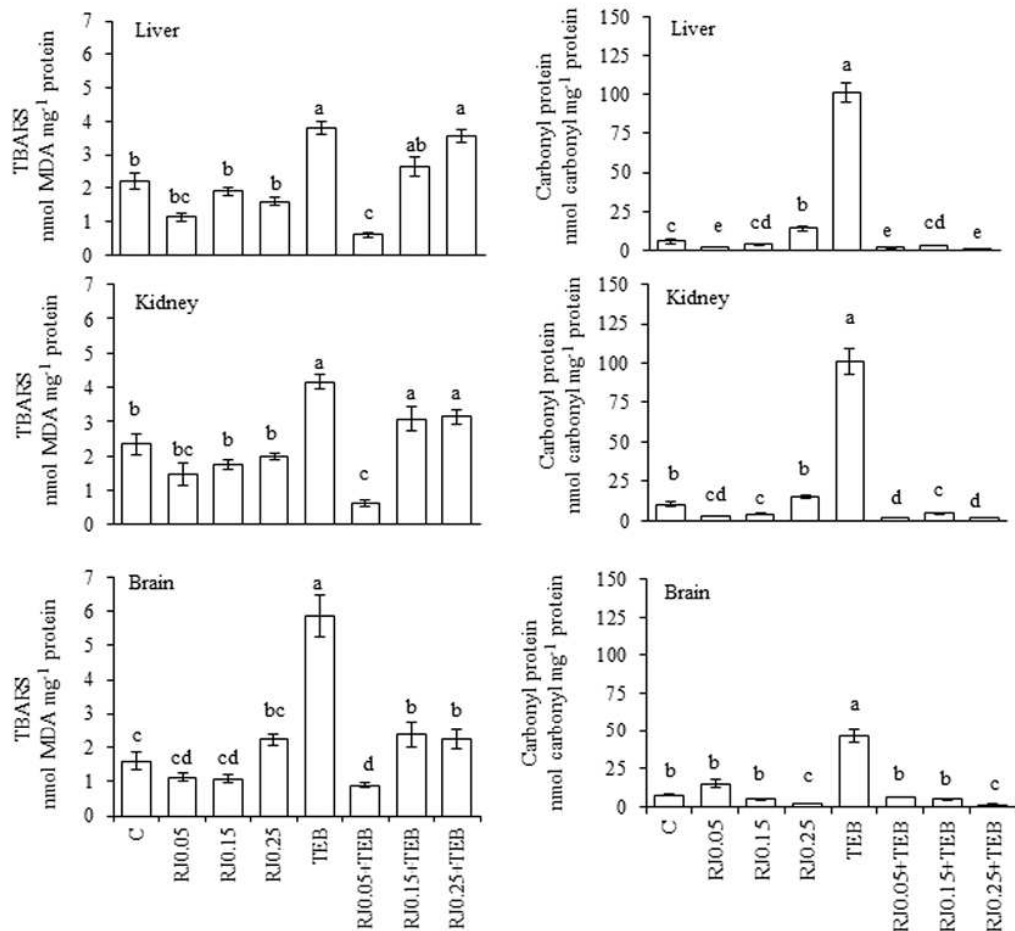


Figure 1. Levels of TBARS (nmol MDA mg⁻¹ protein) and protein carbonyls (nmol carbonyl mg⁻¹ protein) in *Rhamdia quelen* exposed to tebuconazole (TEB), royal jelly (RJ) or a combination of RJ and TEB. Contaminant-free (C). The different small letters indicate significant differences between the means (ANOVA followed by Tukey's multiple range test). The values represent the means \pm SEM; n = 12, p < 0.05. doi:10.1371/journal.pone.0074499.g001

conducted in February of 2012 in the facilities of the University of Passo Fundo (28°15'S/52°24'W, 687 m above sea level).

Ethical Note

This study was approved by the Ethics Commission for Animal Use (CEUA) of the Universidade de Passo Fundo, UPF, Passo Fundo, RS, Brazil (Protocol#3/2011-CEUA, July 2009) and has met the guidelines of the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA; <http://www.cobea.org.br>).

Fish and housing conditions

We used the South American catfish jundiá (*Rhamdia quelen*, Heptapteridae, Teleostei) as a model fish, which are usually cultured in ponds near crop production fields. This species is endemic to southern South America and suitable for cultivation in

any region with a temperate or subtropical climate. The toxicological responses of this species have been extensively researched [12–16].

Three hundred eighty four (96 fish per experiment) mixed-sex, 6-month-old *R. quelen* weighing 118 ± 15 g were bred and maintained at the Universidade de Passo Fundo. The fish inhabited a 6200-L plastic tank before being transferred to the experimental tanks where they were maintained under a natural photoperiod. The fish were fed twice daily (10:00 and 16:00 h) with commercially extruded food at 5% of their body weight (42% crude protein, 3400 kcal kg⁻¹ of digestive energy (DE)). The water temperature ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) and dissolved oxygen concentrations (5.9 mg L^{-1}) were measured with a YSI model 550A oxygen meter (Yellow Spring Instruments, Yellow Spring, USA). The pH values (6.4–7.2) (Bernauer pH meter), total ammonia-N ($<0.6 \text{ mg L}^{-1}$), total

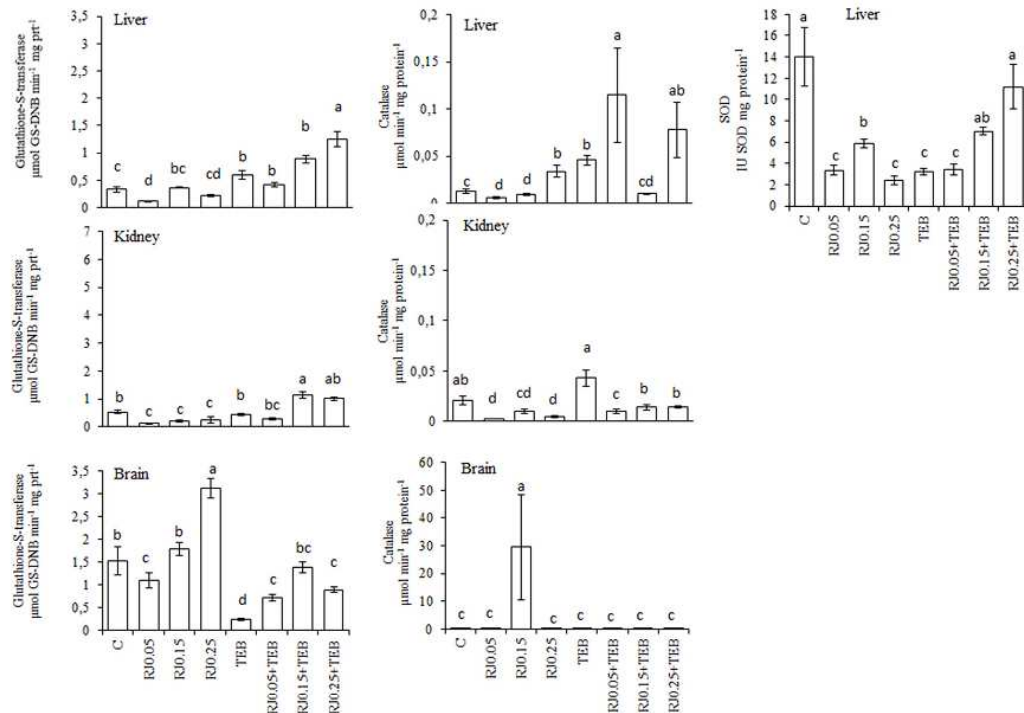


Figure 2. Levels of Glutathione-S-transferase (GST, $\mu\text{mol GS-DNB min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$), catalase (CAT, $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$) and superoxide dismutase (SOD, IU SOD mg protein^{-1}) activities in *Rhadia quelen* exposed to tebuconazole (TEB), royal jelly (RJ) or a combination of RJ and TEB. Contaminant-free (C). The different small letters after the means indicate significant differences (ANOVA followed by Tukey's multiple range test); $p < 0.05$, $n = 12$. doi:10.1371/journal.pone.0074499.g002

alkalinity ($55 \text{ mg L}^{-1} \text{ CaCO}_3$) and hardness ($60 \text{ mg L}^{-1} \text{ CaCO}_3$) of the water were measured using colorimetric tests.

Experimental design

For each experiment, the fish were distributed into eight experimental groups (24 1000-L fiberglass tanks, three tanks per treatment group) after acclimation. Each treatment group was divided into three tanks containing 200 L of chlorine-free, well-aerated tap water; no water changes or agrichemical replacement methods were enacted. Similar sex ratios were maintained between the replicates of the treatment groups. The fish housed in tanks 1 to 3 (the C group) were not exposed to any contaminants or bee products, whereas the fish housed in tanks 13 to 15 were exposed to 0.88 mg L^{-1} (corresponding to 16.6% of the 96-h LC_{50} , [13]) of TEB (Folicur 200 CETM).

TEB is a fungicide that is widely applied to cereal crops; this compound is a class II environmental hazard (dangerous to the environment and highly toxic to aquatic organisms) according to the Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) and the Environmental Protection Agency (EPA). TEB exhibits systemic action and persists in the environment for 20–25 days. Folicur 200 CE, which is a commercial TEB formulation, is toxic to aquatic organisms and causes oxidative stress [16,17] as well as endocrine disruption in fish [14].

TEB exhibits toxic effects on the liver, blood and adrenal glands. It is rapidly absorbed from the gastrointestinal tract and reaches peak plasma concentrations within hours. TEB metabolism in the body is affected mostly by oxidation and is eliminated from organs and tissues rapidly through fecal and urinary routes [18]. This compound demonstrates low bioaccumulation and the bioaccumulation factor is 65 (average) for intact fish (measured in several species of fish) [19]. Fish are particularly sensitive to the influence of pesticides because they absorb and retain dissolved xenobiotics in the water by active or passive transport [20].

In the RJ experiment, the fish housed in tanks 4 to 12 were exposed to waterborne RJ at three concentrations (three tanks per concentration): 0.005, 0.015 and 0.025 g L^{-1} . The fish housed in tanks 16 to 24 were exposed to the same RJ concentrations in combination with TEB (RJ+TEB). In the second set of experiments, the fish were exposed to 0.025, 0.075 or 0.125 g L^{-1} of H as well as the same H concentrations in combination with TEB (H+TEB). In the third set of experiments, BP was added to the water at concentrations of 0.01, 0.03 and 0.05 g L^{-1} either alone (tanks 4 to 12) or in combination with TEB (BP+TEB; tanks 16 to 24). In the fourth set of experiments, we added 0.01, 0.05 and 0.1 g L^{-1} of aqueous extract of P to tanks 4 to 12. These three concentrations were administered in combination with 0.88 mg L^{-1} of TEB (P+TEB) in tanks 16 to 24.

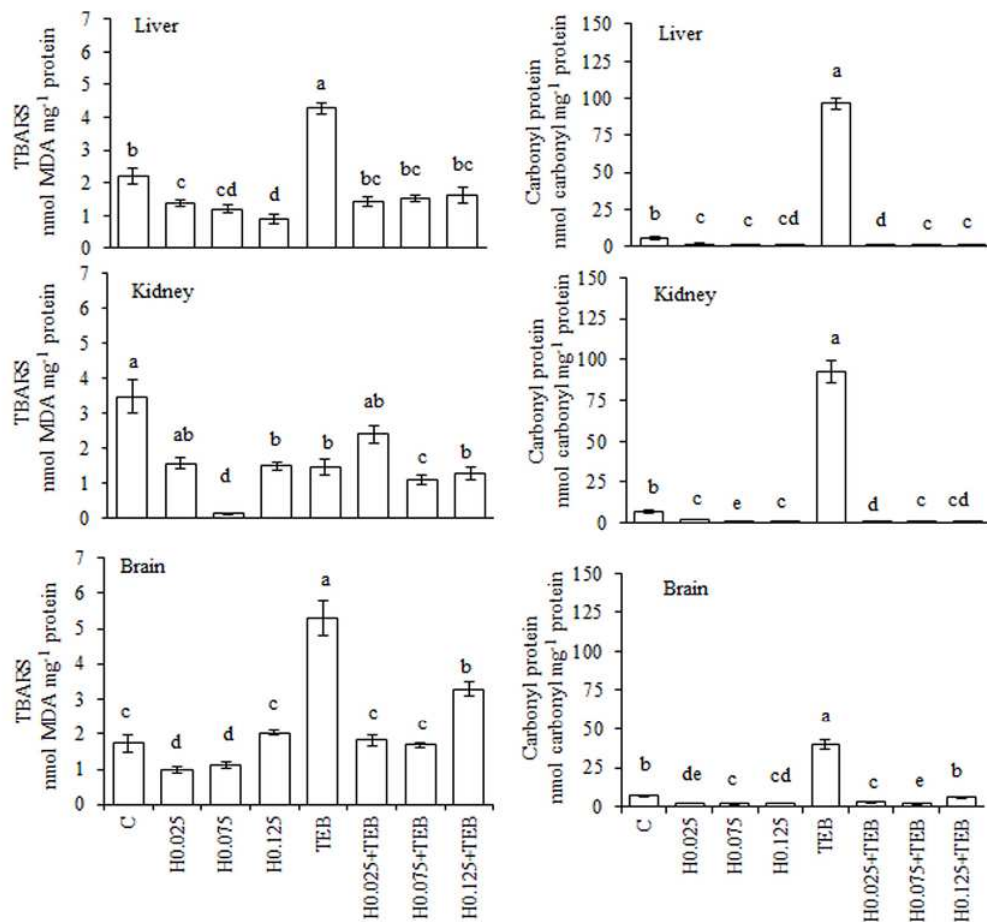


Figure 3. Levels of TBARS (nmol MDA mg⁻¹ protein) and protein carbonyls (nmol carbonyl mg⁻¹ protein) in *Rhamdia quelen* exposed to tebuconazole (TEB), honey (H) or a combination of H and TEB. Contaminant-free (C). The different small letters indicate significant differences between the means (ANOVA followed by Tukey's multiple range test). The values represent the means \pm SEM; n = 12. p < 0.05. doi:10.1371/journal.pone.0074499.g003

In all experiments, the conditions (treatments) were applied for 96 hours (acute exposure) and all fish were subsequently sampled. The study followed the same protocol that is commonly used for acute toxicity studies resulting from a single exposure [13].

Sampling

The fish were anesthetized with MS-222 in NaHCO₃ (300 mg L⁻¹) buffer, captured and killed by spinal section/decapitation before being dissected for tissue collection. The liver, kidney and brain tissues were immediately frozen in liquid nitrogen and stored for analysis.

After sampling, all of the dead fish were frozen and shipped to a biological waste facility. After each experiment, the contaminated water was retained in fiberglass tanks for a minimum of 30 days before being percolated in septic ponds. The tanks were cleaned with running water and rinsed with ethanol.

Chemicals and honeybee products

TEB was obtained commercially. Bovine serum albumin, 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), Triton X-100, hydrogen peroxide (H₂O₂), malondialdehyde (MDA), 2-thiobarbituric acid (TBA) and sodium dodecyl sulfate (SDS) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). The H, P, RJ and BP used in this study were produced at the Centro de Pesquisa Agropecuária (CEPAGRO) at the Universidade de Passo Fundo, Brazil.

The concentration of TEB in the water was analyzed immediately after inoculation in addition to 48 and 96 hours after inoculation using high-pressure liquid chromatography (HPLC) with a TEB-specific method developed by Zhao [21]. The concentrations of all other compounds were analyzed using the method described by Zanella *et al.* [22].

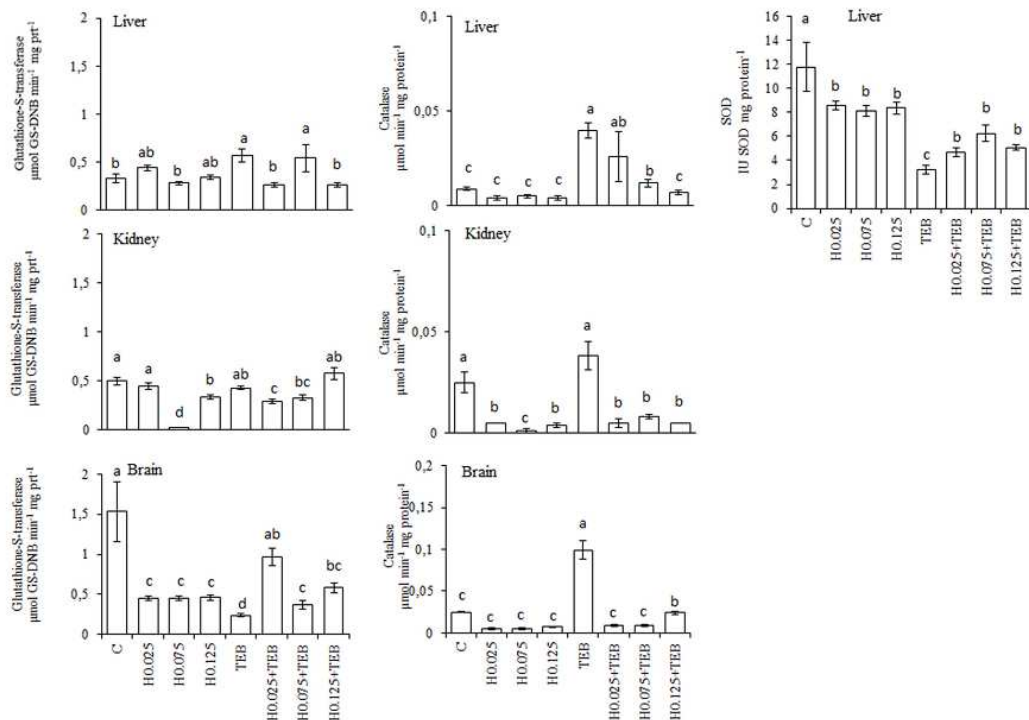


Figure 4. Levels of Glutathione-S-transferase (GST, $\mu\text{mol GS-DNB min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$), catalase (CAT, $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$) and superoxide dismutase (SOD, IU SOD mg protein^{-1}) activities in *Rhamdia quelen* exposed to tebuconazole (TEB), honey (H) or a combination of H and TEB. Contaminant-free (C). The different small letters after the means indicate significant differences (ANOVA followed by Tukey's multiple range test); $p < 0.05$, $n = 12$. doi:10.1371/journal.pone.0074499.g004

Parameters measured

The protein levels were estimated spectrophotometrically using the method described by Bradford [23], and bovine serum albumin was used as the standard.

The peroxides produced by the fish can be indirectly quantified using the TBARS assay, which measures a major product of LPO (malonic dialdehyde) [24]. This assay is performed by reacting MDA with TBA, and the results are assessed optically. The tissue samples were homogenized using 10% trichloroacetic acid (TCA) with a motor-driven Teflon pestle; the homogenates were centrifuged at $1000 \times g$ for 10 min. The liver homogenates (100–400 μL) were added to 8.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 2.5 M acetic acid (pH 3.4) and 0.8% thiobarbituric acid, and the final volume was adjusted to 2.0 mL. The reaction mixture was placed in a microcentrifuge tube and incubated for 90 min at 95°C . After cooling, the sample was centrifuged at $5000 \times g$ for 10 min, and the optical density was determined at 532 nm. The TBARS levels are expressed as nmol MDA per mg of protein, as described by Ohkawa *et al.* [25].

For protein carbonyl determination, liver tissue was homogenized in 10 volumes (w/v) of 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) with a glass homogenizer. The protein carbonyl content was determined using the method described by Yan *et al.* [26] with

minor modifications. Briefly, the homogenates were diluted to $0.7\text{--}0.8 \text{ mg mL}^{-1}$ of protein, and 1 mL aliquots were mixed with 0.2 mL of 2,4-dinitrophenylhydrazine (10 mM DNPH) or 0.2 mL of 2 M HCl. After 1 h of incubation at room temperature in a dark room, 0.5 mL of denaturing buffer (150 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8) containing 3% SDS), 2.0 mL of heptanes (99.5%) and 2.0 mL of ethanol (99.8%) were added sequentially, vortexed for 40 s and centrifuged for 15 min. The isolated protein was washed two times with 1 mL of ethyl acetate/ethanol (1:1 v v⁻¹) and suspended in 1 mL of denaturing buffer. Each DNPH sample was read at 370 nm in a Femto Scan spectrophotometer against a corresponding sample (blank), and the total carbonylation level was calculated using a molar extinction coefficient of $22000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Enzymatic defense antioxidant system

Catalase (CAT; EC 1.11.1.6) activity was assayed using ultraviolet spectrophotometry [27]. Samples of liver tissue were homogenized in a Potter-Elvehjem glass/Teflon homogenizer with 20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4 with 0.1% Triton X-100 and 150 mM NaCl, 1:20 dilution) and centrifuged at $10,000 \times g$ for 10 min at 4°C . Briefly, the assay mixture consisted of 2.0 mL potassium phosphate buffer (50 mM at pH 7.0),

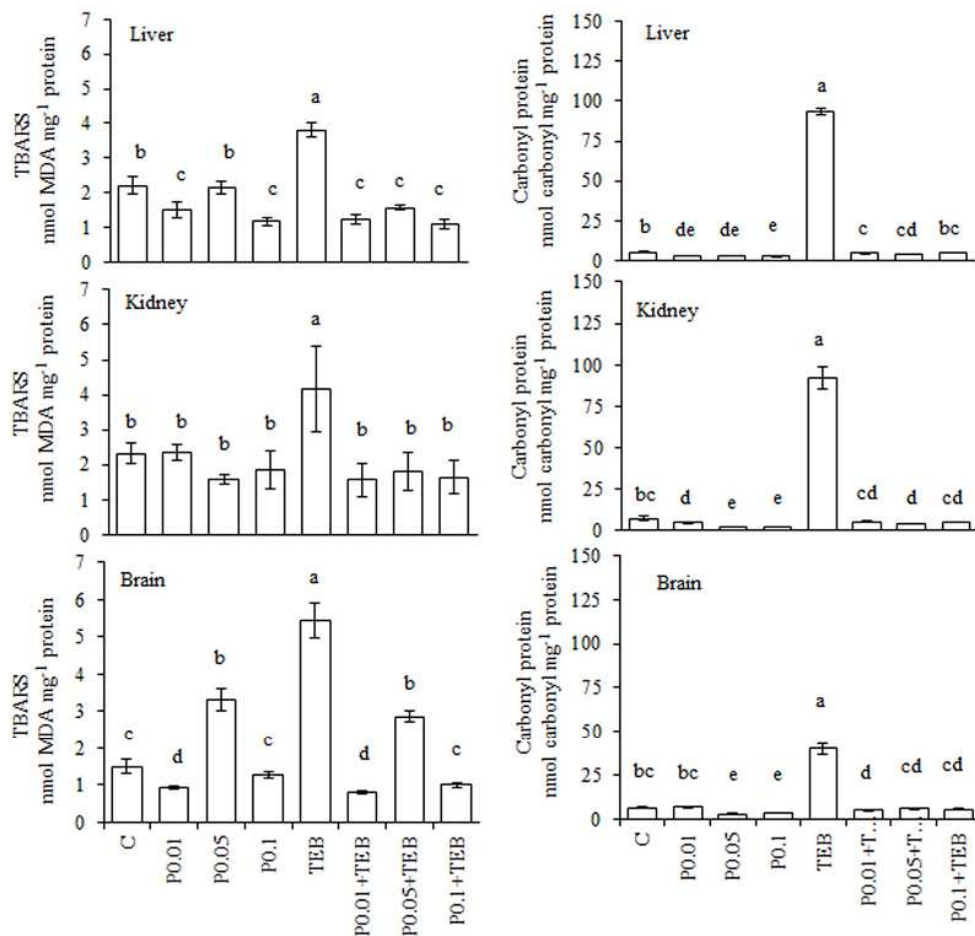


Figure 5. Levels of TBARS (nmol MDA mg⁻¹ protein) and protein carbonyls (nmol carbonyl mg⁻¹ protein) in *Rhamdia quelen* exposed to tebuconazole (TEB), propolis (P) or a combination of P and TEB. Contaminant-free (C). The different small letters indicate significant differences between the means (ANOVA followed by Tukey's multiple range test). The values represent the means \pm SEM; n = 12, p < 0.05. doi:10.1371/journal.pone.0074499.g005

0.05 mL H₂O₂ (0.3 M) and 0.05 mL homogenate. Changes in the H₂O₂ absorbance after 60 s were measured at 240 nm. The catalase activity was calculated as $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{protein min}^{-1}$.

Glutathione S-transferase (GST) activity was determined using the method described by Habig *et al.* [28]. The reaction mixture consisted of 33 mM Hepes buffer (pH 7.5), 1.5 mM GSH, 1.5 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) and water in a total volume of 1 mL. The conjugation of GSH with CDNB using GST activity was recorded spectrophotometrically at 340 nm over 3 min. The activity was reported as nmol of CDNB conjugate formed min⁻¹ mg⁻¹ of protein.

Superoxide dismutase (SOD) activity was performed in liver tissue; this method is based on the inhibition of the reaction of radical superoxide with adrenalin, as described by McCord and Fridovich [29]. In this method, the SOD present in the sample competes with the detection system for radical superoxide molecules. A unit of SOD is the amount of enzyme that inhibits

the speed of oxidation of adrenalin by 50%. The oxidation of adrenalin generates a colored product, adrenochrome, which is detected using a spectrophotometer. SOD activity is determined by measuring the speed of adrenochrome formation, which is observed at 480 nm, in a reaction medium containing glycine-NaOH (50 mM at pH 10) and adrenalin (1 mM).

Non-enzymatic anti-oxidants

The ascorbic acid (AsA) content of the brain and liver was determined at 524 nm. Briefly, brain and liver samples were homogenized (1:10 w/v) in 20% TCA and centrifuged at 11,300 $\times g$ for 3 min. Samples (250 μL) of the supernatant were mixed with 250 μL of water plus 25 μL 0.02% 2,6-dichlorophenolindophenol; the resultant mixture was incubated for 1 h at room temperature. After, 250 μL of a 2% thiourea and 5% metaphosphoric acid solution and 250 μL of 0.2% dinitrophenylhydrazine in 12 M sulfuric acid were added to the solution.

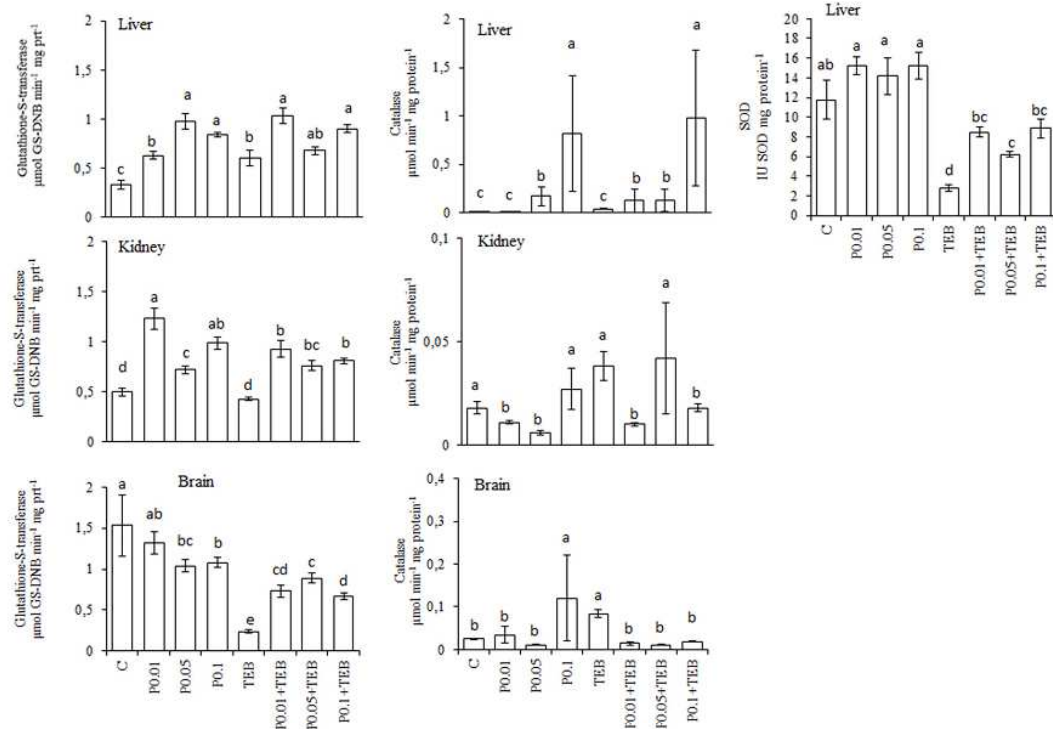


Figure 6. Levels of Glutathione-S-transferase (GST, $\mu\text{mol GS-DNB min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$), catalase (CAT, $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$) and superoxide dismutase (SOD, IU SOD mg protein^{-1}) activities in *Rhamdia quelen* exposed to tebuconazole (TEB), propolis (P) or a combination of P and TEB. Contaminant-free (C). The different small letters after the means indicate significant differences (ANOVA followed by Tukey's multiple range test); $p < 0.05$, $n = 12$. doi:10.1371/journal.pone.0074499.g006

The reaction tubes were incubated in a 60°C water bath for 3 h. After the incubation, $500 \mu\text{L}$ of 18 M sulfuric acid was added, and the tubes were centrifuged at $500 \times g$ for 10 min. The absorbance was read and compared to a standard containing 100 nmol of AsA; the results were expressed in $\mu\text{mol g}^{-1}$ of tissue [30].

Statistical analysis

The means \pm standard error of the mean (SEM) for each group were calculated. Hartley's and Kolmogorov-Smirnov tests were used to determine the homogeneity of the variance and normality, respectively; the log-transformation was performed when necessary. Because the premises for using parametric tests were met, we conducted a multivariate analysis of the variance complemented by Tukey's multiple range test, which was used to compare all of the means using the GraphPad InStat 3.00 statistical package (GraphPad Software; San Diego, California, USA). Statistical significance was accepted at $p < 0.05$.

Results

Immediately after inoculation, the TEB concentration measured in the water was close to 0.88 mg L^{-1} (97.3%, 0.856 mg L^{-1}), which was the nominal concentration. Forty-eight hours after inoculation, the TEB concentration reached 79% of the nominal concentration (0.695 mg L^{-1}), and 96 hours after

inoculation, the TEB concentration was approximately 50% of the nominal concentration (0.439 mg L^{-1}). Exposure to TEB did not cause mortality in the fish.

Royal jelly

The TEB treatment increased the TBARS generation and protein carbonylation (Fig. 1). The lowest RJ concentration decreased TEB-induced TBARS generation in the liver and kidneys. In the brain, all three RJ concentrations reduced the TEB-induced TBARS generation. All of the RJ concentrations blocked the TEB-induced increases in protein carbonyls. The results for the enzyme activity assays are depicted in Fig. 2. The GST activity was increased in the liver for treatments using RJ0.015+TEB and RJ0.025+TEB; CAT activity was also increased with RJ0.005+TEB and RJ0.025+TEB, whereas SOD was augmented by RJ0.015+TEB and RJ0.025+TEB. In the kidneys, the GST activity increased under RJ0.015+TEB and RJ0.025+TEB treatments, whereas the CAT activity was similar to the control values. In the brain, the GST and CAT activities were similar to the control values at all three RJ+TEB concentrations.

Honey

Treatment with TEB increased the TBARS generation and protein carbonylation in all examined tissues (Fig. 3) except for the

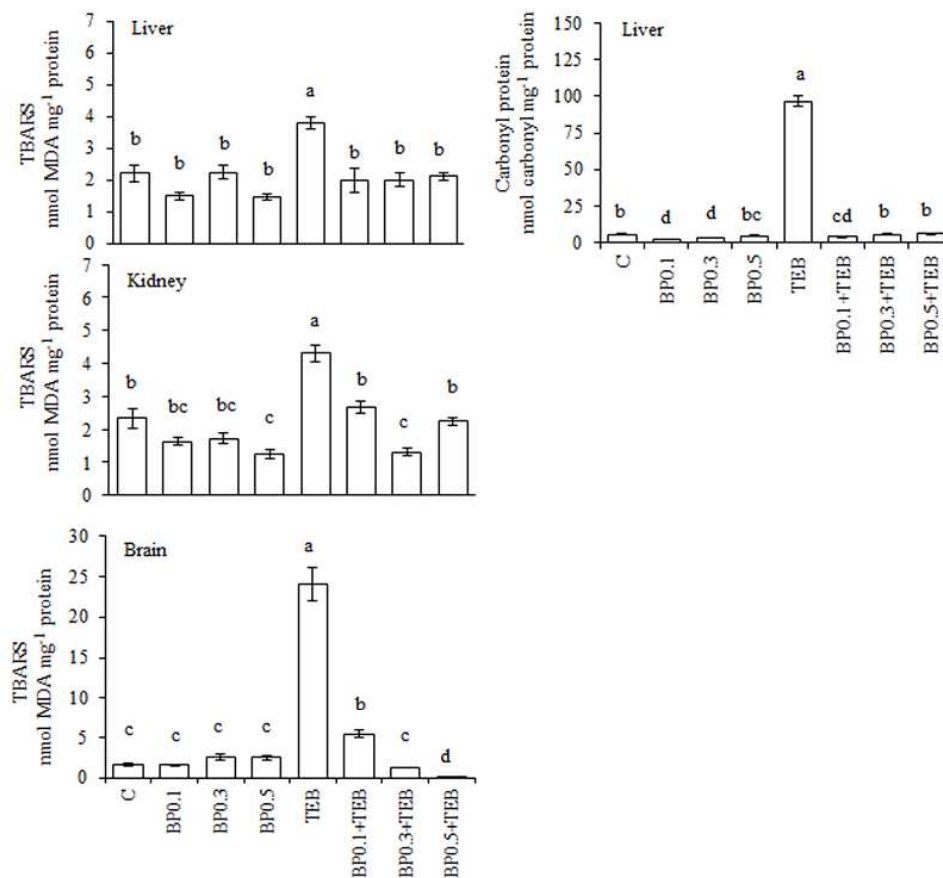


Figure 7. Levels of TBARS (nmol MDA mg⁻¹ protein) and protein carbonyls (nmol carbonyl mg⁻¹ protein) in *Rhamdia quelen* exposed to tebuconazole (TEB), bee pollen (BP) or a combination of BP and TEB. Contaminant-free (C). The different small letters indicate significant differences between the means (ANOVA followed by Tukey's multiple range test). The values represent the means \pm SEM; n = 12, p < 0.05. doi:10.1371/journal.pone.0074499.g007

kidneys. In the liver and brain tissues, H completely blocked the TEB-induced TBARS generation; however, only the highest two H concentrations exhibited this effect in the kidneys. All of the concentrations of H blocked TEB-induced protein carbonylation in all tissue samples. In Fig. 4, we present the results of all enzymatic activity assays. In the liver, the GST activity increased under H0.025+TEB treatment, CAT increased with H0.025+TEB and H0.075+TEB and was augmented in TEB-exposed fish and SOD activity was increased under all three H+TEB treatments relative to the control values. In the kidney tissue, GST increased in the H0.125+TEB group, whereas all H+TEB were similar to the control group for CAT activity during H treatments. Regarding the brain tissue, GST activity was increased for the three H+TEB treatments compared to the TEB-exposed fish, whereas CAT activity was similar to the control in all three H+TEB groups and was augmented in the TEB-exposed fish.

Propolis

TEB treatment increased TBARS generation and protein carbonylation; however, these effects were completely blocked by the P treatments (Fig. 5). The GST, CAT and SOD activities are summarized in Fig. 6. In the liver, the GST and CAT activities were increased in the three P+TEB concentrations relative to the TEB and C fish, whereas SOD activity was higher in the three P+TEB concentrations relative to the TEB-exposed fish. Similarly, GST activity was higher for the three P+TEB treatments relative to the TEB-exposed fish, whereas CAT activity was augmented in TEB and with the P0.05+TEB treatments. In the brain tissue, GST activity was increased in all three P+TEB concentrations relative to the TEB group, and CAT activity in the P+TEB groups was similar to the isolated P groups.

Bee pollen

The TEB-induced augmentation of the TBARS generation and protein carbonylation were prevented by BP at every tested

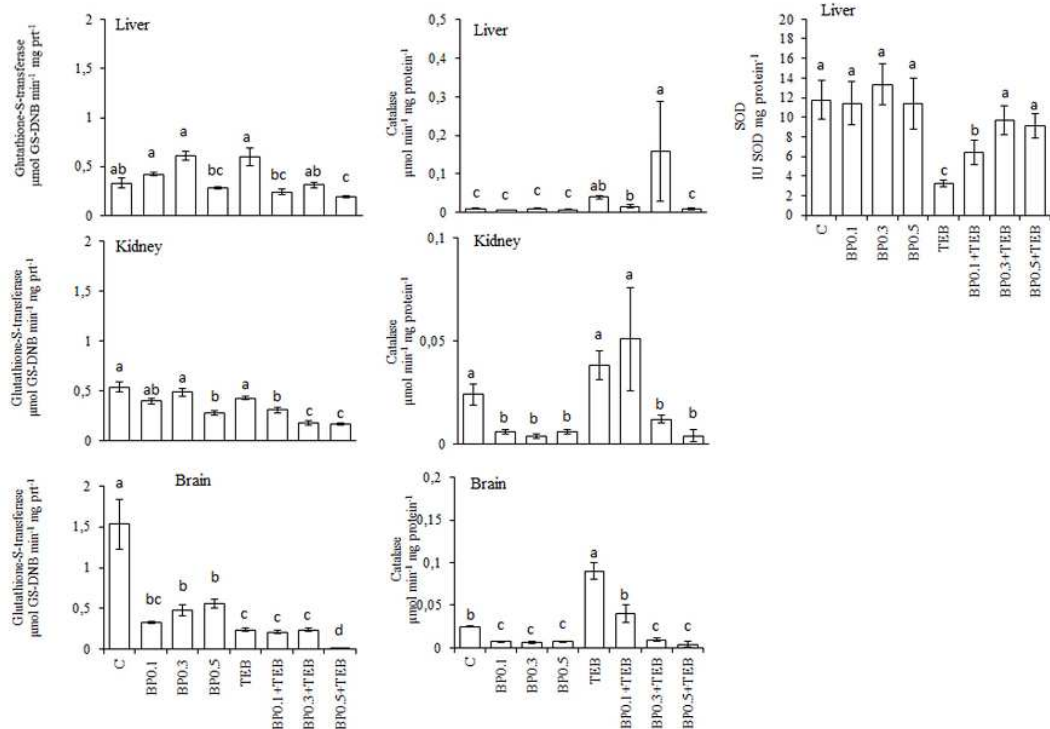


Figure 8. Levels of Glutathione-S-transferase (GST, $\mu\text{mol GS-DNB min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$), catalase (CAT, $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$) and superoxide dismutase (SOD, IU SOD mg protein⁻¹) activities in *Rhamdia quelen* exposed to tebuconazole (TEB), bee pollen (BP) or a combination of BP and TEB. Contaminant-free (C). The different small letters after the means indicate significant differences (ANOVA followed by Tukey's multiple range test); $p < 0.05$, $n = 12$. doi:10.1371/journal.pone.0074499.g008

concentration (Fig. 7). The anti-oxidant enzymatic activities are depicted in Fig. 8. In the liver, GST activity was increased in the TEB-exposed fish but was similar to the control values for the BP0.1+TEB and BP0.3+TEB treatments. The CAT activity was increased during the TEB and BP0.3+TEB treatments, whereas the SOD activity increased in the three BP+TEB groups. The GST activity decreased in the three BP+TEB groups compared to the TEB-treated and C fish, whereas the CAT was increased in the TEB and BP0.1+TEB groups for kidney tissue. The GST activity in the brain tissue of the BP0.1+TEB and BP0.3+TEB groups was similar to the TEB-exposed fish, whereas the same activity was greatly decreased in the BP0.5+TEB group. The brain tissue exhibited increased CAT activity in TEB-exposed fish, and the activity was similar to the control for BP0.1+TEB.

Discussion

In this study, we demonstrated that waterborne bee products, including royal jelly, honey, propolis and bee pollen, reversed the oxidative damage induced by TEB exposure. The increased levels of TBARS and protein carbonyls observed in the TEB-exposed fish were prevented or reversed when the TEB-inoculated water was supplemented with various bee products. Our results confirm

the previous findings regarding TEB toxicity [16,17] as well as the antioxidant potential of bee products [11].

Several studies have previously demonstrated the antioxidant properties of bee products, which can be attributed to the high content of phenolic substances. These effects were most likely generated by the high levels of polyphenols in these substances [5–9], which can act as antioxidants and free radical scavengers.

LPO is one of the major processes activated in response to xenobiotic-induced oxidative stress. Xenobiotics, such as fungicides, induce LPO in several fish species [31]. LPO can be indirectly assayed by measuring the generation of TBARS, which reflects the intensity of LPO by quantifying malonic dialdehyde, which is one of its main products [24]. The protein carbonyl levels are also a biomarker for xenobiotic exposure in fish. Protein carbonylation causes conformational changes in proteins and reduces their catalytic activity. In addition, carbonylation initiates the degradation of proteins through protease activity [32].

All of the treatments with bee products generated an increase in at least one of the enzymatic antioxidant activities. Therefore, the predominant mechanisms for the reversal of oxidative damage appear to be the augmentation of SOD, CAT and GST enzyme activities.

SOD is the first enzyme to respond to free-radical generation, and it exhibits the most robust response to oxidative stress [33,1]. This study demonstrated that SOD activity increased in all groups treated for TEB exposure with RJ, H, P and BP compared to TEB-exposed fish. The actions of CAT are primarily catalytic as it promotes the decomposition of hydrogen peroxide to form water and oxygen [34]. CAT protects living organisms from ROS, which are a cause oxidative stress [35]. GST is involved in the detoxification of many xenobiotics and protects tissues from oxidative stress [36]. The GST activity increased in the livers of TEB-exposed fish treated with some of the concentrations of RJ and P. In addition, GST activity was elevated in the livers, kidneys and brains of fish exposed to P. Increased GST activity has been previously observed when *R. quelen* and other fish species were exposed to xenobiotics [37,38].

We observed a clear interaction between the SOD and CAT activities during the reversal of oxidative damage. The increased SOD activity, which is responsible for catalyzing the conversion of the superoxide anion to H₂O₂, might explain the increase in CAT activity, which catalyzes the reduction of H₂O₂ to H₂O and O₂, in TEB-exposed fish. The decreased CAT activity in “TEB+ bee products” treatments reflects the protective action and/or reversal of damage induced by the bee products. The combined action of both enzymes is a major component of the primary antioxidant defense system [39].

Increasing the enzymatic antioxidant defense network constitutes the most probable mechanism for the bee product-mediated prevention or reversal of oxidative damage caused by TEB. Increases in the enzymatic activity after agrichemical exposure have been previously reported by our laboratory [11,17].

The proper actions of protective enzymes are essential for the health of a body while combating ROS because ROS are responsible for several deleterious effects, including DNA damage, which ultimately alters and impairs intracellular metabolism and can occasionally cause cell death [40].

The levels of AsA were augmented by RJ, BP and P in all of the studied tissues (data not shown). AsA converts ROS into harmless species, and the derivatives of AsA are unreactive. AsA functions

as an antioxidant *in vivo* [17]; therefore, amplifying the AsA levels may also be an important role in the prevention or reversal of oxidative damage. Previous studies [41,11] have also found that increases in the AsA contents are an important component of the antioxidant defense system in fish.

We used gross honeybee products instead of isolated or synthetic polyphenols to study, and eventually offer to fish growers, an accessible technology based on products commonly found or produced on a farm. In addition, gross honeybee products are more easily handled and applied in the ponds than isolated and synthetic polyphenols, which require specialized environments and techniques for handling and quantification. Furthermore, the isolated/synthesized polyphenols are difficult and expensive to obtain in the required amounts.

We researched the antioxidant properties of natural products intensively to find economically viable alternatives with low environmental impact; these studies increased the interest in the various compounds contained in bee products as well as *in natura* [10].

In this study, RJ, H, BP and P prevented and/or reversed tissue oxidative damage induced by TEB. Increases in the enzymatic activities of SOD, CAT and GST are the most likely mechanism of action for the protective effects of bee products against tissue oxidation and damage.

Our data opens new possibilities for the usage of honeybee products as nutritional goods for their enhanced antioxidant properties and in aquaculture to protect fish from oxidative damage caused by environmental exposure to pro-oxidant contaminants. In addition, integrated family-based agriculture, where fish, bees and other animals are husbanded together, might facilitate the development of honeybee products for consumption and enhance aquaculture.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: LJGB DF. Performed the experiments: GK JGSR DG TAO MSA. Analyzed the data: LJGB. Contributed reagents/materials/analysis tools: HCR LCK VLL AM. Wrote the paper: LJGB DF.

References

- Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol* 13: 57–149.
- Ahmad I, Hamid T, Fatima M, Chand HS, Jain SK, et al. (2000) Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Chaanna punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Biochim Biophys Acta* 1523: 37–48.
- Oruç EO, Sevgiler Y, Uner N (2004) Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. *Comp Biochem Physiol Part C* 137: 43–51.
- Southorn PA, Powis G (1998) Free radicals in medicine. *Nature and biologic reactions*. Mayo Clinic Proceeding 63: 381–389.
- Morse RA (1990) ABC and XYZ of Bee Culture – 40th Edition. 516p.
- Ángelo PM, Jorge N (2007) Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. *Revista Instituição Adolfo Lutz*, 66: 232–240.
- Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Pérez-Álvarez JA (2008) Functional Properties of Honey, Propolis, and Royal Jelly. *J Food Sci* 73:117–124.
- Nakajima Y, Tsuruma K, Shimazawa M, Mishima S, Hara H (2009) Comparison of bee products based on assays of antioxidant capacities. *BMC Complem Altern Med* 9:4.
- Neves LC, Alencar SM, Carpes ST (2009) Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonoides totais em amostras de pólen apícola de *Apis mellifera*. *Brazil J Food Technol VII*, BMCFB.
- Ghelfof N, Engeseth NJ (2002) Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of *in vitro* lipoprotein oxidation in human serum samples. *J Agricult Food Chem* 50: 3050–3055.
- Ferreira D, Unfer TC, Rocha HC, Kreutz LC, Koakoski G, et al. (2012) Antioxidant activity of bee products added to water in tebuconazole-exposed fish. *Neotrop Ichthyol* 10: 215–220.
- Soso AB, Barcellos LJG, Ranzani-Paiva MJ, Kreutz LC, Quevedo RM, et al. (2007) Chronic exposure to sub-lethal concentration of a glyphosate-based herbicide alters hormone profiles and affects reproduction of female Jundia (*Rhamdia quelen*). *Environ Toxicol Pharmacol* 23: 300–313.
- Kreutz LC, Barcellos LJG, Silva TO, Anziliero D, Martins D, et al. (2008) Acute toxicity testing of agricultural pesticides on silver catfishes (*Rhamdia quelen*), fingerlings. *C Rural* 38: 1050–1055.
- Cericato L, Neto JGM, Fagundes M, Kreutz LC, Quevedo RM, et al. (2008) Cortisol response to acute stress in jundia *Rhamdia quelen* acutely exposed to sublethal concentrations of agrichemicals. *Com Biochem Physiol C* 148: 281–286.
- Cericato L, Neto JGM, Kreutz LC, Quevedo RM, Rosa JGS, et al. (2009) Responsiveness of the interrenal tissue of Jundia (*Rhamdia quelen*) to an *in vivo* ACTH test following acute exposure to sublethal concentrations of agrichemicals. *Com Biochem Physiol C* 149: 363–367.
- Ferreira D, Motta AC, Kreutz LC, Toni C, Loro VL, et al. (2010) Assessment of oxidative stress in *Rhamdia quelen* exposed to agrichemicals. *Chem* 79: 914–921.
- Toni C, Ferreira D, Kreutz LC, Loro VL, Barcellos LJG (2011) Assessment of oxidative stress and metabolic changes in common carp (*Cyprinus carpio*) acutely exposed to different concentrations of the fungicide tebuconazole. *Chem* 83: 579–584.
- Secretaria da Agricultura e do Abastecimento (nd) Intoxicações por trifloxistrobina e tebuconazole. Available: <http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Fungicidas/NATIVO.pdf>. Accessed: 2012 June 12.
- Ficha de dados de segurança (2013) Available: http://www.selectis.pt/fichas_seg/Riza.pdf. Accessed 2011 January 12.
- Sancho E, Villarrol MJ, Fernández C, Andreu E, Ferrando MD (2010) Short term exposure to sublethal tebuconazole induces physiological impairment in male zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicol Environ* 73: 370–376.

Bee Products Prevent Oxidative Damage in Fish

21. Zhao YG, Zhang Y, Zhang BB, Hu GJ, Zhang XZ, et al. (2008) Determination of Tebuconazole in Water Using Solid Phase Extraction and HPLC. *J China Nat Knowl Infrastruct Journal*, 4.
22. Zanella R, Primel EG, Gonçalves FF, Kurz MHS, Mistura C (2003) Development and validation of a high-performance liquid chromatographic procedure for the determination of herbicide residues in surface and agriculture waters. *J Separat Sci* 26: 935–938.
23. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254.
24. Lushchak OV, Kubrak OI, Lozinsky OV, Storey JM, Storey KB, et al. (2009a) Chromium (III) induces oxidative stress in goldfish liver and kidney. *Aqua Toxicol* 93:45–52.
25. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochem* 95: 351–358.
26. Yan LJ, Traber MG, Packer L (1995) Spectrophotometric method for determination of carbonyls in oxidatively modified apolipoprotein B of human low-density lipoproteins. *Anal Biochem* 228: 349–351.
27. Nelson DP, Kiesow LA (1972) Enthalphy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solution in the UV). *An Biochem* 49:474–478.
28. Habig WH, Pabst MJ, Jacoby WB (1974) Glutathione S-transferase, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249: 7130–7139.
29. McCord JM, Fridovich I (1969) Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemocuprein. *J Biol Chem* 244:6049–6055.
30. Carr RS, Bally MB, Thomas P, Neff JM (1983) Comparison of methods for determination of ascorbic acid in animal tissues. *Anal Chem* 55:1229–1232.
31. Ahmad I, Pacheco M, Santos MA (2004) Enzymatic and non enzymatic antioxidants as an adaptation to phagocyte-induced damage in *Anguilla anguilla L.* following in situ harbor water exposure. *Ecotoxicol Environ Saf* 57:290–302.
32. Almroth BC, Sturve J, Berglund A, Förlin L (2005) Oxidative damage in celpout (*Coregonus nipharus*), measured as protein carbonyls and TBARS, as biomarkers. *Aquat Toxicol* 73:171–180.
33. Winston GW, Di Giulio RT (1991) Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aqua Toxicol* 19:137–161.
34. Schonbaum GR, Chance B (1976) in *The Enzymes* (3rd edn., ed. P. D. Boyer) (New York: Academic Press) 13, p. 363.
35. Zamocky M, Koller F (1999) Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and *in vitro* mutagenesis. *Prog Bioph Molec Biol* 72:19–66.
36. Fournier D, Bride JM, Poirier M, Berge JB, Plapp FW (1992) Insect glutathione-S-transferases: biochemical characteristics of the major forms of houseflies susceptible and resistant to insecticides. *J Biol Chem* 267:1840–1845.
37. Simonato JD, Albinati AC, Martinez CBR (2006) Effects of the water soluble fraction of diesel fuel oil on some functional parameters of the neotropical freshwater fish *Psectrogaster laticaudus Valenciennes*. *Bul Environ Contam Toxicol* 76:505–511.
38. Shailaja MS, D'Silva C (2003) Evaluation of impact of PAH on a tropical fish, *Oreochromis mossambicus* using multiple biomarkers. *Chem* 8:835–841.
39. Gaetani GF, Galiano S, Canepa L, Ferraris AM, Kirkman HN (1989) Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. *Blood* 73:334–339.
40. Halliwell B, Gutteridge JMC (1989) *Free radicals in biology and medicine*. 2nd ed. Oxford: Clarendon.
41. Sayeed I, Parvez S, Pandey S, Bin-Hafeez B, Haque R, et al. (2003) Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch). *Ecotoxicol Environ Saf* 56:295–301.

7. DISCUSÃO GERAL

Segundo Wilson e Tisdell (2001), o consumo mundial de pesticidas tem chegado a 2,6 milhões de toneladas e deste total, 85% são utilizados na agricultura. Considerando a América Latina, o Brasil desponta como o maior consumidor de agrotóxicos, com um consumo estimado em 50% da quantidade comercializada nesta região. Estes englobam compostos quimicamente bastante diferenciados, que podem ser agrupados em quatro categorias principais: os organofosforados, os piretróides, os organoclorados e os carbamatos (Oliveira-Silva *et al.*, 2001).

A poluição dos ecossistemas aquáticos pode provocar a perda da biodiversidade. A poluição a nível de população tem degradado ecossistemas fundamentais por meio de alterações moleculares nos peixes, refletindo na diminuição da qualidade e da sustentabilidade destes ecossistemas. A contaminação dos recursos aquáticos no nível de organismo é alvo de preocupações humanas, tendo em vista que o consumo direto e indireto de peixes e água contaminada pode causar sérios danos ao organismo (Ramsdorf, 2007).

Os peixes estão frequentemente expostos ao impacto das ERO porque, diferentemente dos vertebrados terrestres, os animais aquáticos são expostos diariamente a mudanças sazonais de temperatura e oxigênio ou a mudanças nas condições ambientais no seu habitat natural, tais como poluição, disponibilidade de oxigênio, pH, incidência da radiação solar, entre outros (Chow, 1991; Winston & Di Giulio, 1991; Henrique *et al.*, 1998). Esta situação é facilmente exemplificada pelos peixes de água doce, que vivem em ambientes instáveis como as águas tropicais (Kramer, 1987; Graham, 1990). Como os outros vertebrados, os peixes possuem sistemas de defesas antioxidantes que utilizam mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos para combater os impactos das ERO (Fraga *et al.*, 1996).

Os sistemas biológicos oferecem condições favoráveis para ocorrência de reações de caráter oxidativo, devido à existência de lipídios insaturados nas membranas celulares, e pela abundância de reações oxidativas que ocorrem durante o metabolismo normal. A susceptibilidade de uma célula ou de um tecido ao estresse oxidativo depende de um grande número de fatores que incluem a disponibilidade de antioxidantes e a capacidade de inativação ou eliminação dos produtos oxidativos formados (Jordão Júnior *et al.*, 1998).

Variações na atividade de enzimas antioxidantes têm sido utilizadas como indicadores de estresse oxidativo mediado por poluentes (Ahmad *et al.*, 2000; Sayeed *et al.*, 2003; Oruç,

2009). A carbonilação de proteínas devido a ação direta das EROs pode causar perda da atividade da enzima e alguns produtos da peroxidação lipídica podem reagir com resíduos de aminoácidos, alterando a função da enzima. Portanto, muitas enzimas envolvidas nos processos de defesa antioxidantes podem ser inativadas pelo excesso de oxidantes (Moraes *et al.*, 2007; Modesto & Martinez, 2010).

Tem sido observado que quando as defesas antioxidantes enzimáticas estão alteradas, defesas secundárias, tais como o ácido ascórbico, podem prevenir reações de auto-oxidação e neutralizar diretamente as EROs (Sayeed *et al.*, 2003). Alguns autores sugerem que as alterações podem resultar em mau funcionamento dos vários sistemas orgânicos dos peixes (Ortiz *et al.*, 2003). Desai *et al.* (1984), relataram distúrbios nos cordões dos hepatócitos, ruptura da membrana celular e vacuolização plasmática no fígado de *Oreocarpus mossambicus*, após exposição a inseticidas organofosforados durante cinco dias.

Por sua natureza, a apicultura é uma atividade econômica conservadora das espécies, devido ao baixo impacto ambiental que ocasiona, possibilitando a utilização permanente dos recursos naturais e a não destruição do meio rural. Assim, é uma das poucas atividades que preenche todos os requisitos do tripé da sustentabilidade: o econômico – gerador de renda para os produtores; o social – ocupador de mão de obra familiar no campo, com diminuição do êxodo rural; e o ecológico – já que não se desmata para criar abelhas, necessitando elas, ao contrário, plantas vivas para a retirada do pólen e do néctar de suas flores, suas fontes alimentares básicas (Alcoforado Filho, 1997; 1998, citado por REIS *et al.*, 2003, p. 1).

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram a atividade antioxidante dos produtos apícolas testados. Várias fontes de antioxidantes naturais são conhecidas e algumas são amplamente encontradas no reino vegetal (Wettasinghe, 1999). Os compostos fenólicos são incluídos na categoria de interruptores de radicais livres, sendo muito eficientes na prevenção da autoxidação (Shahidi *et al.*, 1992).

Dentre os resultados mais expressivos encontrados em nosso trabalho está a proteção/reversão da LPO fornecida pelos produtos apícolas. O mecanismo de ação dos antioxidantes, presentes em extratos de plantas, possui um papel importante na redução da oxidação lipídica em tecidos, vegetal e animal, pois quando incorporado na alimentação humana não conserva apenas a qualidade do alimento, mas também reduz o risco de desenvolvimento de patologias, como arteriosclerose e câncer (Namiki, 1990; Ramarathnam *et al.*, 1995).

Uma inovação em nossos trabalhos é quantificação dos agroquímicos na água. Sua persistência na água. Em muitos países em desenvolvimento os poluentes orgânicos

persistentes POPs ainda são utilizados na agricultura no controle de vetores de doenças (Stap, 2004). Os ecossistemas aquáticos tropicais estão entre os mais ameaçados pela degradação ambiental, mas ainda são poucas as pesquisas realizadas para avaliar e monitorar o impacto de contaminantes nesses ecossistemas tropicais e em sua biota aquática (Lacher & Goldstein, 1997). A recente resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (Conama) que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento (Brasil, 2005), proíbe o lançamento dos poluentes orgânicos persistentes nos efluentes e determina que, quando apropriado, a qualidade dos ambientes aquáticos poderá ser avaliada por indicadores biológicos utilizando-se organismos e/ou comunidades aquáticas.

8. CONCLUSÃO

A geleia real, mel, pólen de abelha e própolis claro prevenida e / ou reverter o dano oxidativo tecidual induzida pelo tebuconazole. O principal candidato a ser o mecanismo de ação de proteção de produtos apícolas contra a oxidação dos tecidos e consequente dano ação parece ser o aumento da atividade enzimática da SOD, CAT e GST. Sendo que SOD e CAT são as enzimas de primeira linha de defesa na ação antioxidante.

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

A diversidade da natureza dos compostos encontrados nos produtos apícolas somado aos resultados positivos encontrados em nosso trabalho requer uma pesquisa mais profunda destes compostos. Sendo nossos objetivos futuros, analisar e quantificar os compostos fenólicos presentes no mel, geleia real, própolis e pólen apícola produzidos no apiário do CEPAGRO da UPF. Uma vez que a separação, identificação, quantificação e aplicação dos compostos fenólicos tornará nosso trabalho mais completo e elucidará possíveis lacunas ainda não elucidadas na pesquisa com estes compostos de um modo geral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, I., HAMID, T., FATIMA, M., CHAND, H.S., JAIN, S.K., ATHAR, M., RAISUDDIN, S. 2000. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. **Biochemistry Biophysics Acta** 1523, 37-48.

ALMROTH, B. C.; STURVE, J.; STEPHENSEN, E.; HOLTH, T. F.; FÖRLIN, L. 2008. Protein carbonyls and antioxidant defenses in corkwing wrasse (*Symphodus melops*) from a heavy metal polluted and a PAH polluted site. **Marine Environmental Research** 66, 271-277.

ÂNGELO, P.M., JORGE, N. 2007. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista Instituição Adolfo Lutz** 66, 232-240.

ANUALPEC 2002: Anuário da pecuária brasileira. Instituto FNP. Ed. FNP Consultoria e Comércio. São Paulo/SP, 400p.

BAGNYUKOVA, T.V.; VASYLKIV, O.Y.; STOREY, K.B.; LUSHCHAK, V.I. 2005. Catalase inhibition by amino triazole induces oxidative stress in goldfish brain. **Brain Research** 1052, 180-186.

BANKOVA, V. S., CASTRO, S. L., MARCUCCI, M. C. 2000. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie** 31, 3-15.

BARATA, C.; VARO, I.; NAVARRO, J.C.; ARUN, S.; PORTE, C. 2005. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. **Comparative Biochemistry Physiology C** 140, 175-186.

BARCELLOS, L.J.G., WOEHL, V.M., WASSERMANN, G.F., KRIEGER, M.H., QUEVEDO, R.M., LULHIER, F. 2001. Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture and tank transference in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard), a South American catfishes. **Aquaculture Research** 32, 123–125.

BARCELLOS, L.J.G., WASSERMANN, G.F., SCOTT, A.P., WOEHL, V.M., QUEVEDO, R.M., ITTZES, I., KRIEGER, M.H., LULHIER, F. 2002. Plasma steroid concentrations in relation to the reproductive cycle of cultured male *Rhamdia quelen*. **Journal Fish Biology** 61, 751–763.

BARCELLOS, L.J.G., KREUTZ, L.C., RODRIGUES, L.B., FIOREZE, I., QUEVEDO, R.M., CERICATO, L., CONRAD, J., SOSO, A.B., FAGUNDES, M., LACERDA, L.A., TERRA, S. 2003. Haematological and biochemical characteristics of male jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard Pimelodidae): changes after acute stress. **Aquaculture Research** 34, 1465–1469.

BARCELLOS, L. J. G., KREUTZ, SOUZA, C., RODRIGUES, L. B., FIOREZE, I., QUEVEDO, R. M., CERICATO, L., SOSO, A. B., FAGUNDES, M., CONRAD, J., LACERDA, L. A., TERRA, S. 2004. Hematological changes in jundia (*Rhamdia quelen* Quoy and Gaimard Pimelodidae) after acute and chronic stress caused by usual aquacultural management, with emphasis on immunosuppressive effects. **Aquaculture** 237, 229-239.

BARCELLOS, L.J.G., KREUTZ, L.C., QUEVEDO, R.M. 2006. Previous chronic stress does not alter the cortisol response to an additional acute stressor in jundia (*Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard) fingerlings. **Aquaculture** 253, 317–321.

BARREIROS, A.L. B. S.; DAVID J.M.; David J.P. 2006. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Sociedade Brasileira de Química** 29, 113-23.

BARLING, D. *et al.* 1993. A glutathione S-transferase with glutathione peroxidase activity from *Arabidopsis thaliana*: molecular cloning and functional characterization. **Europe Journal Biochemistry** 216, 579-586.

BASIM, E.; BASIM, H.; ÖZCAN, M. 2006. Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens. **Journal of Food Engineering**, Oxon 77 (4), 992-996.

BAYER CROP SCIENCE LIMITED. 2005. **Environmental Information Sheet Folicurs MAPP** number11278.CPAGuidanceNotesversion3. &EIS.

BELLO, A.R., FORTES, E., BELLO-KLEIN, A., BELLO, A.A., LLESUY, S.F., ROBALDO, R.B., BIANCHINI, A., 2000. Lipid peroxidation induced by *Clinostomum detrunctum* in muscle of the freshwater fish *Rhamdia quelen*. **Diseases of aquatic organisms** 42 (3), 233– 236.

BOZZETTI, M. & SCHULZ, U.H. 2004. An index of biotic integrity based on fish assemblages for subtropical streams in southern Brazil. **Hydrobiologia**, 529: 133-144.

BOWMER, K.H. 1987. Herbicides in surface waters. In Herbicides. (D.H. Hutson & T.R. Roberts, Eds.). **John Wiley, New York**, 271-355.

BRASIL. 2001. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 3, de 19 de janeiro DE 2001. Diário Oficial da União. Brasília p.18. 23 de janeiro de 2001, seção 1.

BRASIL. 2005. Ministério do meio ambiente. Conselho nacional do meio ambiente. Resolução 357, de 17 de março de 2005. Diário Oficial da União, 18 de março de 2005.

BUEGE, J.A., AUST, S.D. 1978. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymology** 52, 302-309.

CAMARGO, J. M. F. de. 1972. **Manual de apicultura, São Paulo, Ed. Agronômica Ceres.**

CAMPOS, M. G.; WEBBY, R. F.; MARKHAM, K. R; MITCHELL, K. A; CUNHA, A. P. 2003. Age-induced diminution of free radical scavenging capacity in bee pollens and the contribution of constituent flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington 51 (3), 742-745.

CARPES, S.T., PRADO, A., MORENO, I.A.M., MOURÃO, G.B., ALENCAR, S.M., MASSON, M.L. 2008. Avaliação do potencial antioxidante do pólen apícola produzido na Região Sul do Brasil. **Química Nova** 31, 1660-1664.

CERICATO, L., NETO, J.G.M., FAGUNDES, M., KREUTZ, L.C., QUEVEDO, R.M., FINCO, J., ROSA, J.G.S., KOAKOSKI, G., CENTENARO, L., POTTKER, E.S., ANZILIERO, DENIZ., BARCELLOS, L.J.G., 2008. Cortisol response to acute stress in

jundia *Rhamdia quelen* acutely exposed to sublethal concentrations of agrichemicals. *Com. Biochem. Physiol. C* 148, 281–286.

CERICATO, L., NETO, J.G.M., KREUTZ, L.C., QUEVEDO, R.M., ROSA, J.G.S., KOAKOSKI, G., CENTENARO, L., POTTKER, E., MARQUEZE, A., BARCELLOS, L.J.G., 2009. Responsiveness of the interrenal tissue of Jundia (*Rhamdia quelen*) to an in vivo ACTH test following acute exposure to sublethal concentrations of agrichemicals. *Com. Biochem. Physiol. C* 149, 363–367.

CHAN, A. C. 1993. Partners in defense, vitamin E and vitamin C. ***Journal Physiology and Pharmacology*** 71 (9), 725-731.

CHELIKANI, P., FITA, I; LOEWEN, P.C. 2004. Diversity of structures and properties among catalases, ***Cellular and Molecular Life Sciences***, 61, p.192-208.

CHOW, C. K. Vitamin-E and oxidative stress. ***Free Radical Biology Medicine***, v. 11, p. 215-232. 1991.

CORD, J.M.; FRIDOVICH, I. 1969. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemoglobin (hemocyanin). ***Journal Biology Chemistry*** 244, 6049-6055.

DANDAPAT, J., G. B. N. CHAINY & K. J. RAO. 2000. Dietary vitamin-E modulates antioxidant defence system in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. ***Comparative Biochemistry Physiology*** 127, 101–115.

DESAI, A.K.; JOSHI, U.M.; AMBADKAR, P.M. 1984. Histological observations on the liver of *Tilapia mossambica* after exposure to monocrotophos, an organophosphorus insecticide, ***Toxicology Letters***, v. 21 p. 325–331.

DORMAN, H. J. D.; KOSAR, M. ; KAHLOS, K.; HOLM , Y. ; HILTUNEN, R. 2003. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, Hybrids, Varieties, and Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington 51 (16), 4563-4569.

DUDLER, R. *et al.* 1991. A pathogen-induced wheat gene encodes a protein homologous to glutathione S-transferases. ***Molecular Plant Microbe Interact*** 4, 14-18.

ELLMAN, G.L. 1959. Tissue sulphydril groups. *Arch. Biochemistry Biophysics* 82, 70-77.

ELLMAN, G.L., COURTNEY, K.D., ANDRES JR., V. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. ***Biochemistry Pharmacology*** 7, 88-95.

FERREIRA, D., MOTTA, A.C., 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.

FERREIRA, D., UNFER, T. C., ROCHA, H. C., KREUTZ, L. C., KOAKOSKI. G., BARCELLOS, L. J. G., 2012. Antioxidant activity of bee products added to water in tebuconazole-exposed fish. ***Neotropical Ichthyology*** 10(1): 215-220.

FORTES NETO, P. 2007. Microbiota do solo como indicadora da poluição do solo e do ambiente. In: SILVEIRA, A.P.D. FREITAS, S.S. Microbiota do solo e qualidade ambiental. **Instituto agrônomo**. 312P.

FRAGA, C.G. *et al.* Antioxidant defenses and mechanisms of protection against oxygenradicals. In: VAL, A.L.; ALMEIDA-VAL, V.M.F.; RANDALL, D.J. (Eds.).

Physiology and biochemistry of the fishes of the amazon. Manaus: INPA, 1996. p. 323-330.

GAETANI, G.F., GALIANO, S., CANEPA, L., FERRARIS, A.M. & KIRKMAN, H.N. (1989) Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. *Blood*, 73, 334–339
 García, M.; Pérez-Arquillue, C.; Juan, T.; Juan, M. I.; Herrera, A. 2001. Note: Pollen analysis and antibacterial activity of Spanish honeys. **Food Science and Technology International**, London 7 (2), 155-158.

GARCÍA, M.; PÉREZ-ARQUILLUE, C.; JUAN, T.; JUAN, M. I.; HERRERA, A. 2001. Note: Pollen analysis and antibacterial activity of Spanish honeys. **Food Science and Technology International**, London, v. 7, n. 2, p. 155-158.

GHELDOLF, N. & ENGESETH, N.J.. 2002. Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples. **Journal Agricultural Food Chemistry** 50, 3050-3055.

GUEDES, D. S. 1980. Contribuição ao estudo da sistemática e alimentação de jundiás (*Rhamdia spp*) na região central do Rio Grande do Sul (Pisces, Pimelodidae). 99 f. **Dissertação (Mestrado em Zootecnia)** – Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

GOMES, M. A . F.; SPADOTTO, C. A . 2002. Impacto de defensivos agrícolas na qualidade da água. **XXV Congresso Paulista de Fitopatologia**. Anais, p.30.

GOMES, L. C; GOLOMBYESQUI, J. CHIPPARI-GOMES, A.R; BALDISSEROTTO, B. 2000. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). **Ciência rural**, 30. 1: 79-185.

GRAHAM, J. B. 1990. Ecological, evolutionary, and physical factors influencing aquatic animal respiration. **Am Zoology**., v. 30, p. 137-146.

HABIG, W.H., PABST, M.J., JACOBY, W.B. 1974. Glutathione S-transferase, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal Biology Chemistry** 249, 7130–7139.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. M. C. 1989. **Free radicals in biology and medicine**. 2. ed. Oxford: Claredon Press, 469 p.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.C. 2000. **Free radicals in biology and medicine**. 3.ed. UK: Oxford University Press, 936 p.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. M. C. 2002. **Free Radicals in Biology and Medicine**, 3rd ed., Oxford University Press: UK.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. 2007. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Nova York: Oxford University Press, v.1, 851p.

HENRIQUE, W. 1998. Silagem de milho, sorgo, girassol e suas consorciações. II. Composição bromatológica, 1998. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1998, Botucatu. **Sociedade Brasileira de Zootecnia**. p.379–381.

INSTRUÇÃO NORMATIVA nº 11 de 20.10.2000 retirada de <http://www.laboran.com.br/textos/legislacao/agricultura/mel/2.html> (acessado em 10 de abril de 2011).

JACQUES-SILVA, M.C.; NOGUEIRA, C.W.; BROCH, L.C.; FLORES, E.M.; ROCHA, J.B.T. 2001. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. **Pharmacology Toxicology** 88, 119-127.

JORDÃO-JUNIOR, AFONSO, A., SILVEIRA, S., FIGUEIREDO, J. F. C. & VANNUCCHI, H. 1998. Urinary excretion and plasma vitamin E levels in patients with AIDS. **Nutrition** 14, 423-426.

JUNIOR-AFONSO, A., SILVEIRA, S., FIGUEIREDO, J. F. C. & VANNUCCHI, H. 1998. Urinary excretion and plasma vitamin E levels in patients with AIDS. **Nutrition** 14, 423-426.

KJAERSTAD, M.B., TAXVIG, C., NELLEMAN, C., VINGGAARD, A.M., ANDERSEN, H.R. 2008. Do azole fungicides possess an endocrine disrupting hazard? **Toxicology Lett** 180, 332–246.

KRAMER, D. L. 1987. Dissolved oxygen and behavior. **Environmental Biology Fish**, v. 18, p. 81-92.

KREUTZ, L.C.; BARCELLOS, L.J.G.; QUEVEDO, R.M.; ANZILIERO, D.; SILVA, T.O.; SILVA, L. B.; RITTER, F.; BEDIN, A.; FINCO, G. 2008. Investigation of acute toxicity of pesticides on jundia (*Rhamdia quelen*), a South American catfish. **Ciência Rural** 38, 1050-1055.

KROYER, G.; HEGEDUS, N. 2001. Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement. **Innovative Food Science & Emerging Technologies** 2 (3), 171-174.

LACHER, T.E. & GOLDSTEIN, M.I. 1997. Tropical ecotoxicology: status and needs. **Environmental Toxicology Chemistry** 16, 100-111.

LUSHCHAK, O.V.; KUBRAK, O.I.; STOREY, J.M.; STOREY, K.B.; LUSHCHAK, V.I. 2009. Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. **Chemosphere** 76, 932-937.

MARAN, E.; FERNÁNDEZ, M.; BARBIERI, P.; FONT, G.; RUIZ, M.J. 2009. Effects of four carbamate compounds on antioxidant parameters. **Ecotoxicology Environol Safety** 72, 922-930.

MARCHINI, L. C; REIS, V. D. A; MORETI, A. C. C. C. 2006. Composição físico-química de amostras de pólen coletado por abelhas africanizadas *Apis mellífera* (Hymenoptera: Apidae) em Piracicaba, estado de São Paulo. **Ciência Rural** 36 (3), 949-953.

MASSELA, R., DI BENEDETTO, R., VARI, R., FILESI, C., & GIOVANNINI, C. 2005. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione related enzymes. **Journal of Nutrition Biochemistry** 16, 577-586.

MEISTER, A.; ANDERSON, M.E. 1983. Glutathione. **Annual Revil Biochemestry** 52, 711-760.

MODESTO, K.A. & MARTINEZ, C.B.R. 2010. Roundup[®] causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere** 78, 294-299.

MONTEIRO, D.A.; 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). **Comparative Biochemistry Physiology C** 143, 141-149.

MORAES, S. B.; LORO, L. V.; GLUSCZAK, L.; PRETTO, A.; MENEZES, C.; MARCHEZAN, E.; MACHADO, DE O. S. 2007. Effects of four rice herbicides on some metabolic and toxicology parameters of teleost fish (*Leporinus obtusidens*). **Chemosphere** 68, 1597-1601.

MOURE, A.; CRUZ, J.M.; FRANCO, D.; DOMÍNGUEZ, J.M.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; NÚÑEZ, M.J.; PARAJÓ, J.C. 2001. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry** 72, 145-171.

MUÑOZ, O., COPAJA, S., SPEISKY, H., PEÑA, R. C., MONTENEGRO, G. 2007. Contenido de Flavonoides Y Compuestos Fenólicos De *Mieles Chilenas* e Índice Antioxidante. **Química Nova** 30 (4), 848-851.

NAKAJIMA, Y., TSURUMA, K., SHIMAZAWA, M., MISHIMA, S., HARA, H. 2009. Comparison of bee products based on assays of antioxidant capacities. **BMC Complementary and Alternative Medicine** 9 (4).

NAMIKI M. 1990. Antioxidants/antimutagens in food. **Critical reviews in Food Science and Nutrition** 29 (4), 273-300.

NELSON, D.P. & KIESOW, L.A. 1972. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 °C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solution in the UV). **Annual Biochemistry** 49, 474–478.

NEVES, L.C., ALENCAR, S.M., CARPES, S.T. 2009. Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonoides totais em amostras de pólen apícola de *Apis mellifera*. **Brazil Journal Food Technology VII**, BMCFB.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S.J. 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology Medicine** 31, 1287-1312.

OLIVEIRA-SILVA, J.J., ALVES, S.R., MEYER, A., PEREZ, F., SARCINELLI, P.N., MATOS, R.C.O.C., MOREIRA, J.C. 2001. Influência de fatores socioeconômicos na contaminação por agrotóxicos, Brasil. **Saúde Pública**, v. 35, p. 130-135.

ORTIZ, J. B.; GONZALES DE CANALES, M. L.; SARASQUETE, C. 2003. Histopathological changes induced by lindane (c-HCH) in various organs of fishes. **Society Mar**, v. 67 (1) p. 53–61.

ORUÇ, E. Ö, SEVGILER, Y., ÜNER, N. 2004. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. **Comparative Biochemistry Physiology C**, v.137, p. 43- 51.

PARVEZ, S.; RAISUDDIN, S. 2005. Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). **Environmental Toxicology Pharmacology** 20, 112-117.

PARVEZ, S.; PANDEY, S.; ALI, M.; RAISUDDIN, S. 2006. Biomarkers of oxidative stress in *Wallago attu* (Bl. and Sch.) during and after a fish-kill episode at Panipat, India. **Science Total Environmental** 368, 627-636.

PEIXOTO, F; ALVES-FERNANDES, D; SANTOS, D; FONTAÍNHAS-FERNANDES, A. 2006. Toxicological effects of oxyfluorfen on oxidative stress enzymes in tilapia *Oreochromis niloticus*. **Pesticide Biochemistry Physiology** 85, 91-96.

PESKIN, A.V; WINTERBOURN, C.C. 2000. A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1). **Clinica Chimica Acta** 293, 157–166.

POLEKSIC, V. & KARAN, V. 1999. Effects of trifluralin on carp: Biochemical and Histological Evaluation. **Ecotoxicology Environmental Safet** 43, 213-221.

PUTTKAMMER, E. 1994. Geléia real - métodos e técnicas de produção, coleta e armazenamento, **EPAGRI: Florianópolis**.

RAMARATHNAM N, OSAWA T, OCHI H, KAWAKISHI S. 1995. The contribution of plant food antioxidants to humans health. **Trends Food Scienc Nutrition** 6 (3), 75-82.

RAMSDORF, W. 2007. Utilização de duas espécies de *Astyanax* (*Astyanax Sp B* e *A. Altiparanae*) como bioindicadores de região contaminada por agrotóxico (fazenda Cangüiri – UFPR). Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 127p.

REIS, V. D. A ; FILHO, COMASTRI, J. A. 2003. Importância da Apicultura no Pantanal Sul-Matogrossense. **Corumbá: Embrapa Pantanal**.

ROBERTS, R.J. 2001. **Fish Pathology**, third ed. Saunders, London. p. 492.

ROE, J.H. 1954. In: D. Glick (Ed.), Methods of Biochemical Analysis. **Interscience** 1, 115–139.

SANCHO, E., VILLARROEL, M.J., FERNÁNDEZ, C., ANDREU, E., FERRANDO, M.D. 2010. Shortterm exposure to sublethal tebuconazole induces physiological impairment in male zebrafish (*Danio rerio*). **Ecotoxicology Environmental** 73, 370–376.

SANTOS, F. A., BASTOS, E. M. A. F., MAIA A. B. R. A., UZEDA, M., CARVALHO, M. A. R., FARIAS, L. M., MOREIRA, E. S. A. 2003. Brazilian propolis: Physicochemical properties, plant origin and antibacterial activity on periodontopathogens. **Phytother Research** 17, 285-289.

SAYEED, I., PARVEZ, S., PANDEY, S., BIN-HAFEEZ, B., RIZWANUL, H., RAISUDDIN, S. 2003. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. **Ecotoxicology Environmental** 56, 295–301.

SHAHIDI F, JANITHA PK, WANASUNDARA PD. 1992. Phenolic antioxidants. **Critic Review Food Science Nutrition**, 32 (1), 67-103.

SILVA, L.B., BARCELLOS, L.J.G., QUEVEDO, R.M., SOUZA, S.M.G., KREUTZ, L.C., RITTER, F., FINCO, J., BEDIN, A. 2006. Alternative species for traditional carp polyculture in southern South America: initial growing period. **Aquaculture** 255, 417–428.

SIES, H. 1993. Oxidative stress, oxidants and antioxidants. **San Diego, CA. Academic press.**

SOSO, A.B., BARCELLOS, L.J.G., RANZANI-PAIVA, M.J., KREUTZ, L.C., QUEVEDO, R.M., ANZILIERO, D., LIMA, M., SILVA, L.B., RITTER, F., BEDIN, A.C., FINCO, J.A. 2007. Chronic exposure to sub-lethal concentration of a glyphosate-based herbicide alters hormone profiles and affects reproduction of female Jundia (*Rhamdia quelen*). **Environmental Toxicology Pharmacology** 23, 308–313.

SOUSA, C. M. DE M., SILVA, H. ROCHA., VIEIRA-JR., MAGELA. G. 2007. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, 30 (2), 351-355.

STADTMAN &, LEVINE R. Protein oxidation. 2000. *Ann NY Academic Science* 899, 191-208.

STAP–SCIENTIFIC AND TECHNICAL ADVISORY PANEL OF THE GLOBAL ENVIRONMENT FACILITY. 2004. **The use of bioindicators, biomarkers and analytical methods for the analysis of POPs in developing countries.**

STEGEMAN, J.J; BROUWER, M.; DI GIULIO, R.T.; FÖRLIN, L.; FOWLER, B.A.; SANDERS, B.M.; VAN VELD, P.A. 1992. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: HUGGET, R.J.; KIMERLE, R.A.; MEHRLE JR, P.M.; BERGMAN, H.L. (eds.) **Biomarkers. Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress.** Boca Raton, Lewis Publishers, p. 235-335.

THE NATIONAL HONEY BOARD. 2003. Honey-Health and therapeutic qualities. **Lashley Street Longmont**. <http://www.nhb.org> (acessado em outubro de 2011).

TONI, C., FERREIRA, D., KREUTZ, L. C., LORO, V. L., BARCELLOS, L. J. G., 2011. Assessment of oxidative stress and metabolic changes in common carp (*Cyprinus carpio*) acutely exposed to different concentrations of the fungicide tebuconazole. *Chem.* 83, 579-584.

ÜNER, N., ORUÇ. E., SEVGYLER, Y. 2005. Oxidative stress-related and ATPase effects of etoxazole in different tissues of *Oreochromis niloticus*. **Environmental toxicology pharmacology** 20, 99-106.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology Pharmacology** 13 (2), 57-149.

VAN HANDEL, E. 1965. Estimation of glycogen in small amount of soft tissue. **Analytic Biochemistry** 11, 256-265.

VIUDA-MARTOS, M., RUIZ-NAVAJAS, Y., FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J., PÉREZ-ÁLVAREZ, J.A. 2008. Functional Properties of Honey, Propolis, and Royal Jelly. **Journal of Food Science** 73, 117-124.

WALTON, W.J., BROWN, K.L., LYDY, M.J. 1997. Diurnal fluctuations in toxicity in two fishes species: *Gambusia affinis* and *Notropis ludibundis*. **Bulletin Environmental Contaminante Toxicology** 59, 414–421.

WANG, X ; KIM, K.W.; BAI, S.C. ; HUH, M.D. ; CHO, B.Y. 2003. Effects of the different levels of dietary vitamin C on growth and tissue ascorbic acid changes in parrot fish (*Oplegnathus fasciatus*). **Aquaculture** 215, 203-211.

WESH, S. O.; MARSTON, R. M. 1983. Nutritional Bioavailability of Zinc. **Cambridge: Royal Society of Chemistry**, 591 p.

WETTASINGHE M, SHAHIDI F. 1999. Evening primrose meal: a source of natural antioxidants and scavenger of hydrogen peroxide and oxygen-derived free radicals. **Journal Agriculture Food Chemistry** 47 (5), 1801-1812.

WHITE, J.W. 1979. Composition of honey. In: CRANE, E. Honey. A comprehensive Survey. London: **Heinemann** 157-207.

WILCE, M. C.; PARKER, M. W. 1994. Structure and function of glutathione S-transferases. **Biochemistry Biophysics Acta** 1205, 1-18.

WILSON, C.; TISDELL, C. 2001. Why farmers continue to use pesticides despite environmental, health and sustainability costs. **Ecology Econ.** v.39 (3), p. 449-462.

WINSTON, G. W & DI GIULIO, R.T. 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. **Aquatic toxicology.** v. 19, p. 137-161.

YAN, L.J., TRABER, M.G., PACKER, L. 1995. Spectrophotometric method for determination of carbonyls in oxidatively modified apolipoprotein B of human low-density lipoproteins. **Annual Biochemistry** 228, 349–351.

ZAR, J.H. 1996. **Biostatistical Analysis**. New Jersey: Prentice Hall. 800p.

ZHANG, J. F; LIU, H; SUN; Y. Y; WANG, X. R; WU, J. C; XUE, Y. Q. 2005. Responses of the antioxidant defenses of the Goldfish *Carassius auratus*, exposed to 2,4 dichlorophenol. **Environtol Toxicology Pharmacology** 19, 185-190.