



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA**

KATHYA ASSMANN MODESTO

**EFEITOS DE DOIS HERBICIDAS À BASE DE GLIFOSATO
PARA UM PEIXE NEOTROPICAL, COM ENFOQUE NOS
BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS**

Londrina
2009

KATHYA ASSMANN MODESTO

**EFEITOS DE DOIS HERBICIDAS À BASE DE GLIFOSATO
PARA UM PEIXE NEOTROPICAL, COM ENFOQUE NOS
BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção de título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia B. R. Martinez

Londrina
2009

KATHYA ASSMANN MODESTO

**EFEITOS DE DOIS HERBICIDAS À BASE DE GLIFOSATO
PARA UM PEIXE NEOTROPICAL, COM ENFOQUE NOS
BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS**

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes
Universidade Federal de São Carlos

Profa. Dra. Silvia Helena Sofia
Universidade Estadual de Londrina

Profa. Dra. Cláudia Bueno dos Reis Martinez
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 27 de Junho de 2009.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, exemplo de tudo, ao Junior pela presença constante, a nossa menininha que está chegando e a Cláudia, pela ajuda neste caminho.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Cláudia, peça fundamental neste processo, por toda ajuda, paciência e confiança. Obrigado por ter me recebido em seu laboratório e por todo auxílio neste período. Você é um exemplo de pessoa e profissional a ser seguido.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao programa e a coordenação do curso de Mestrado em Ciência Biológicas da UEL.

Ao departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina.

Aos funcionários da Estação de Piscicultura da UEL (EPUEL).

A minha banca, Silvia e Marisa, pela presença e pelas sugestões que muito servirão.

A Marta, por ser minha banca na qualificação, pela ajuda no lab, pelas conversas, lamento não tê-la conhecido antes.

As meninas, companheiras, Lindalva, Marina e Juliana, agora minhas amigas. Obrigado pela ajuda nos experimentos, nas análises, pelos cafés da manhã, pelos almoços no shopping e tudo que acompanhou. Acredito que nossa amizade não acaba aqui.

A todo o pessoal do laboratório: Dalita (companheira de Roundup), Natália (discípula de Roundup Transorb), Rafael, Gabriel, as Lús, Carol, Mariana, Andréia, Esther, Vanessa. Alguns já não estão mais presentes, mas me ajudaram bastante principalmente nos experimentos, pois ninguém faz nada sozinho!

A Deus pela vida, pela família maravilhosa que me deu, pelo companheiro que colocou em meu caminho, pelos amigos, por estar me proporcionando a graça de ser mãe, por tudo o que me ajudaste a conquistar e por estar sempre ao meu lado.

Aos meus pais, a quem devo absolutamente tudo o que sei e que sou, pelo eterno exemplo que são, por serem os primeiros a acreditar em mim sempre, pelo amor, carinho e apoio incondicional.

A minha irmã querida, minha melhor amiga... obrigado pelos momentos de uma vida inteira.

Ao Junior, amor da minha vida e meu companheiro... que apareceu do nada e mudou pra sempre meu caminho. Obrigado pela compreensão, apoio, paciência e por fazer seus os meus projetos e desejos.

Agradeço a todos que participaram direta ou indiretamente deste trabalho.

MODESTO, Kathya Assmann. **Efeitos de dois herbicidas à base de glifosato para um peixe neotropical, com enfoque nos biomarcadores bioquímicos.** 2009. 81p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

RESUMO

O Roundup® (RD) é um herbicida a base de glifosato e é um dos mais utilizados no mundo por ser considerado pouco tóxico, apresentar alta eficiência, baixo custo e o fato de ser rapidamente degradado pelo meio ambiente. Nessa formulação, além do glifosato o POEA é adicionado como surfactante. O Roundup Transorb® (RDT) é um produto lançado mais recentemente, que contém o mesmo princípio ativo, mas que utiliza em sua formulação uma mistura de surfactantes. Os efeitos destes dois produtos foram avaliados para o peixe neotropical *Prochilodus lineatus*, utilizando-se parâmetros de estresse oxidativo, com a atividade hepática das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione transferase (GST), o conteúdo hepático de glutathione reduzida (GSH) e a ocorrência de peroxidação lipídica (LPO). Foi analisada também a atividade da acetilcolinesterase (AChE) no cérebro e no músculo, e no caso do RDT foram analisados parâmetros hematológicos. Em uma série experimental juvenis de *P. lineatus* foram expostos a 10 mg.L⁻¹ de Roundup® (RD) ou apenas à água (CTR). Em outra série de experimentos os peixes foram expostos a 1mg.L⁻¹ de Roundup Transorb® (RDT1), 5mg.L⁻¹ de Roundup Transorb® (RDT5) ou apenas a água (CTR). Em ambas as séries os peixes foram expostos aos diferentes meios experimentais por 6, 24 e 96 h, em testes de toxicidade estáticos. Após a exposição, os peixes foram amostrados para a coleta de amostras de fígado, cérebro e músculo, e nos experimentos com RDT amostras de sangue também foram coletadas. Os peixes expostos ao RD, durante 24h, apresentaram redução na atividade da SOD e GPx e aumento no conteúdo de GSH, em relação aos respectivos CTR. Após 24 e 96h os peixes dos grupos RD apresentaram aumento da LPO e na atividade da GST em relação aos respectivos CTR. A atividade da AChE foi inibida no cérebro após 96h e no músculo após 24 e 96h de exposição ao RD. Já nos experimentos com RDT, os animais expostos a maior concentração testada durante 24 e 96h, apresentaram aumento no número de eritrócitos, e de leucócitos após 96h. Nos peixes do grupo RDT5 ocorreu redução significativa da SOD após 6 h e da CAT após 6 e 24 h de exposição. A CAT também foi menor nos peixes do grupo RDT1, após 24 h de exposição, em relação ao respectivo CTR. A atividade da GPx foi maior nos peixes do grupo RDT5, após 24 e 96h de exposição, a em relação aos respectivos CTR. O conteúdo de GSH foi menor nos RDT1 e RDT5 após 24h, mas aumentou significativamente após 96h de exposição ao RDT5, em relação aos respectivos controles. Nos peixes expostos ao RD5 a atividade da GST foi reduzida após 6 e 24 h de exposição, em relação aos grupos CTR. Verificou aumento significativo da LPO apenas no grupo RDT1, após 6 h de exposição. A atividade da AChE foi inibida no cérebro dos peixes dos grupos RDT1 e RDT5 após 96h, em relação aos respectivos controles. Com base nos resultados apresentados conclui-se que a exposição aguda ao RD e ao RDT interfere nas enzimas antioxidantes, na biotransformação e reduzem a

atividade da acetilcolinesterase. Observou-se também que o RDT é mais tóxico para *P.lineatus* que o RD, embora apenas o RD tenha promovido lipoperoxidação. Desta forma, percebeu-se que as vias pelas quais estes herbicidas atuam devem se diferentes, visto que as alterações observadas não foram correspondentes.

Palavras-chaves: Acetilcolinesterase. Defesas antioxidantes. Glifosato. *Prochilodus lineatus*. Roundup[®]. Roundup Transorb[®].

MODESTO, Kathya Assmann. **Effects of two glyphosate-based herbicides for a Neotropical fish, with emphasis on biochemical biomarkers.** 2009. 81p. Dissertation (Master on Biological Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

ABSTRACT

Roundup® (RD), a glyphosate-based herbicide, is one of the most used pesticides over the world, probably because its active ingredient is relatively nontoxic and degrades rapidly in the environment, besides its high efficiency and low cost. However, this herbicide also contains polyethoxylated tallowamines (POEA), which acts as the surfactant. Roundup Transorb® (RDT) is a more recent Roundup formulation, which contains a surfactant blend containing 15% POEA. However, the composition of this surfactant blend is considered a trade secret and more information about it is not given. The effects of these two herbicides were evaluated on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*, by using some oxidative stress parameters, such as liver activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione transferase (GST), the hepatic content of reduced glutathione (GSH) and the occurrence of lipid peroxidation (LPO). The activity of brain and muscle acetylcholinesterase (AChE) was also measured. In fish exposed to RDT hematological parameters were also analyzed. In one experimental series, juveniles of *P. lineatus* were exposed to 10 mg.L⁻¹ of Roundup® (RD), or only to clean water (CTR). In the other series, fish were exposed to 1mg.L⁻¹ of Roundup Transorb® (RDT1), 5mg.L⁻¹ of Roundup Transorb® (RDT5) or only to clean water (CTR). In both series fish were exposed to the experimental medium for 6, 24 e 96 h, in static toxicity tests. After exposure, fish were sampled in to collect liver, brain and muscle, and in the experiments with RDT, blood samples were taken. Fish exposed to RD for 24h showed SOD and GPx activity reduction and an increase in GSH content. After 24 and 96h fish from RD groups showed an increase in GST activity and LPO. AChE was inhibited in the brain after 96h and in muscle tissue after 24 and 96h of exposure to RD. Fish exposed to RDT5 for 24 e 96h showed an increased in the number of erythrocytes, and in the number of leucocytes after 96h exposure. In fish exposed to RDT5 there was a reduction in SOD activity after 6h, and in CAT activity after 6 and 24 h of exposure. CAT activity was also reduced in fish exposed to RDT1, after 24h. GPx activity was higher in fish exposed to RDT5, for 24 and 96h. GSH content was lower in fish exposed to RDT1 and RDT5 for 24h, but increased after 96h exposure to RDT5. Fish exposed to RD5 for 6 and 24h showed a decrease in GST activity. An increase in LPO was verified only in fish exposed to RDT1, for 6h. AChE activity was inhibited in the brain of fish exposed to RDT1 e RDT5 for 96h. Considering these results, we can conclude that acute exposures to RD and RDT interfered with antioxidant defenses and biotransformation and inhibited AChE activity. It was also verified that RDT is more toxic in comparison to RD, although only RD has led to LPO. Thus, it can be suggested that both glyphosate-based herbicides promote a disruption in antioxidant defenses, however they probably act through different mechanisms or routes, since the alterations observed were not corresponded between them. This distinction in

mechanisms of toxicity probably reflects the differences in the surfactant composition used in each formulation of Roundup.

Keywords: Acetylcholinesterase. Antioxidant defenses. Glyphosate. *Prochilodus lineatus*. Roundup[®]. Roundup Transorb[®].

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 POLUIÇÃO AQUÁTICA.....	11
1.2 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS	13
1.2.1 Acetilcolinesterase	13
1.2.2 Enzimas de Detoxificação de Xenobióticos.....	15
1.2.3 Defesas Antioxidantes.....	16
1.2.4 Marcadores de Danos Oxidativos	18
1.3 HERBICIDAS ROUNDUP® E ROUNDUP TRANSORB®	19
1.4 CURIMBA (<i>PROCHILODUS LINEATUS</i>)	23
2 OBJETIVOS	25
2.1 OBJETIVO GERAL	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
3 ARTIGO I	26
A exposição aguda ao Roundup® promove estresse oxidativo e inibição da acetilcolinesterase no peixe <i>Prochilodus lineatus</i>	27
4 ARTIGO II	48
Alterações hematológicas e bioquímicas em <i>Prochilodus lineatus</i> após exposição aguda ao herbicida Roundup Transorb®	49
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
REFERÊNCIAS	73

1 INTRODUÇÃO

1.1 POLUIÇÃO AQUÁTICA

Embora três quartos da superfície da Terra sejam compostas de água, a maior parte não está disponível para consumo humano pois 97% são água salgada, encontrada nos oceanos e mares e 2% formam geleiras inacessíveis. Apenas 1% de toda a água é doce e pode ser utilizada para consumo do homem e animais. E deste total 97% estão armazenados em fontes subterrâneas. Por essa razão, o uso racional e a manutenção da qualidade da água existente tornam-se essenciais.

A poluição aquática está comumente associada com a descarga de efluentes domésticos, industriais ou agrícolas (MANSON, 1996). Quando analisamos o uso da água pela população no mundo, vemos que a maior parte do consumo, cerca de 70%, está relacionada à agricultura (NEBEL; WRIGHT, 1998). Esta situação leva a um aumento da concentração de efluentes desta atividade na água. Dentre os principais efluentes podemos citar a grande quantidade de agrotóxicos que é utilizada nessa prática e que como resultado final, alcança os corpos d'água.

Os agrotóxicos são substâncias químicas utilizadas combater, prevenir ou controlar uma praga. Existem várias classes de agrotóxicos, como inseticidas, herbicidas, fungicidas, raticidas entre outros. Cada grupo apresenta vários itens com diferentes princípios ativos, diferentes modos de ação e conseqüentemente, variados níveis de toxicidade. Os herbicidas estão entre os agrotóxicos mais utilizados na agricultura.

Segundo Rand et al. (1995) a introdução de herbicidas nos ambientes aquáticos pode ocorrer de diversas maneiras: acidentalmente durante a fabricação, durante as aplicações (como por exemplo, por meio da pulverização aérea), ou pelo escoamento superficial dos solos após aplicações nas lavouras. As aplicações repetidas na agricultura e em pastagens são consideradas as maiores rotas de movimento de pesticidas para os corpos d'água (NIMMO, 1985; JIRAUNGKOORSKUL

et al., 2002). Ainda podem ser aplicados diretamente nos meios aquáticos para a eliminação de espécies indesejáveis como plantas, algas e vetores de doenças humanas (RAND et al., 1995).

Embora a maior parte dos países exija testes de toxicidade com organismos aquáticos para registro de novos agrotóxicos, os estudos são conduzidos principalmente, com espécies de ambiente temperado, e geralmente os países tropicais se pautam nessas informações. Poucos estudos envolvendo os efeitos tóxicos de agrotóxicos para organismos aquáticos foram desenvolvidos nos trópicos com espécies tropicais, tanto para questão de registro de produtos como para análise de impacto no ambiente aquático (LACHER; GOLDSTEIN, 1997).

A presença de herbicidas no meio aquático pode causar alterações nas comunidades aquáticas, podendo levar inclusive a mortalidade em massa. De forma geral, os poluentes podem exercer seus efeitos de várias maneiras, dependendo das características do corpo d'água receptor, da comunidade biológica presente no local e do próprio poluente. Em alguns casos, os agentes tóxicos podem matar os animais; em outros, concentrações menores desses agentes podem promover efeitos subletais. Alguns poluentes podem se acumular em tecidos dos organismos e exercer seus efeitos após exposição prolongada a concentrações muito baixas, que dificilmente são detectadas quimicamente (ABEL, 1989).

Para monitorar a situação dos corpos d'água, o Conselho Nacional Do Meio Ambiente (CONAMA - resolução n° 357/2005) determina que a qualidade dos ambientes aquáticos seja avaliada por indicadores biológicos, utilizando-se organismos e/ou comunidades aquáticas. Vários são os parâmetros utilizados que podem ser utilizados como indicadores biológicos. Peixes e invertebrados aquáticos são considerados bons indicadores, pois podem acumular pesticidas em concentrações muito maiores do que as da água, uma vez que esses compostos podem se ligar a matéria orgânica que é ingerida por esses animais (NIMMO, 1985). Os biomarcadores também representam uma classe de indicador biológico muito importante, pois representam qualquer alteração biológica relacionada à presença de um composto químico no ambiente no nível individual, indicando um desvio do estado normal que não pode ser detectado no organismo intacto (VAN GESTEL; VAN BRUMMELEN, 1996).

Os biomarcadores são excelentes ferramentas para monitorar a saúde do ecossistema aquático e fazem parte de vários programas modernos de monitoramento ambiental (MARTINEZ et al., 2006).

1.2 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

Os biomarcadores bioquímicos são normalmente os primeiros sinais de alterações biológicas a serem detectados, em razão da presença de poluentes, além disso, são sensíveis a várias classes de poluentes, apresentam alta especificidade e fornecem informações a respeito do efeito metabólico causado pelo xenobiótico (VAN DER OOST et al., 2003). Dentre os biomarcadores bioquímicos, os mais extensamente investigados são as alterações da atividade da acetilcolinesterase, as enzimas envolvidas na detoxificação de xenobióticos e de seus metabólitos, as enzimas e compostos antioxidantes e os marcadores de danos oxidativos.

1.2.1 Acetilcolinesterase

As colinesterases hidrolisam a acetilcolina nas sinapses colinérgicas dos animais. Duas colinesterases estão presentes nos vertebrados, a acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase (BChE). A distribuição dessas enzimas depende da espécie e do tecido em questão. As diferenças entre as duas estão principalmente relacionadas ao excesso de substrato, que inibe a atividade da AChE, mas não interfere na atividade da BChE (NUNES-TAVARES et al., 2002). A BChE parece estar envolvida em processos de detoxificação, metabolismo de lipídeos, regeneração celular, regulação de proliferação celular e na diferenciação neural durante o desenvolvimento inicial (MACK; ROBITZKI, 2000).

A atividade da AChE é utilizada como biomarcador há bastante tempo. A inibição da atividade é reconhecida para peixes expostos a carbamatos e organofosforados (MONSSERRAT et al., 2002). Os ensaios para AChE em diferentes tecidos como biomarcador são métodos sensíveis para detecção contaminação aquática por vários herbicidas (SANCHO et al., 2000). Os ensaios são realizados principalmente com cérebro e músculo, sendo que a atividade no cérebro é mais bem estudada em relação ao músculo (FERRARI et al., 2007).

Apesar de ser um biomarcador amplamente empregado por muitos anos, as variações da atividade da acetilcolinesterase em peixes expostos a pesticidas ainda não estão bem compreendidas. Em jundiás (*Rhamdia quelen*) expostos a três herbicidas, clomazone (isooxazolidinone), quincorac (quinoline) e metilsulfuron (sulfonilurea), em diferentes concentrações, observou-se que o clomazone inibiu a atividade da enzima no cérebro e no músculo, em todas as concentrações enquanto o quincorac e o metilsulfuron aumentaram a atividade no cérebro e diminuíram-na no músculo (MIRON et al., 2005). Gluszczak et al. (2006) estudaram a atividade da AChE em *Leporinus obtusidens*, piavas, expostos a diferentes concentrações de Roundup® e observaram diminuição da atividade da enzima no cérebro, independente da concentração utilizada. O mesmo resultado se confirmou em outro estudo, com jundiás expostos a duas concentrações do mesmo herbicida, onde houve diminuição da atividade da enzima no cérebro (GLUSCZAK et al., 2007).

Distúrbios na atividade da AChE pode afetar a locomoção e o equilíbrio, apetite, fuga e comportamento reprodutivo (BRETAUD et al., 2000). O sistema neuromuscular em peixes é principalmente colinérgico e sua atividade é essencial para o comportamento e função muscular normal (PAYNE et al., 1996). A inibição da AChE muscular causa hiperestimulação das fibras musculares podendo levar a tetania, paralisia ou morte (KIRBY et al., 2000).

1.2.2 Enzimas de Detoxificação de Xenobióticos

Quando um xenobiótico entra no organismo, ele passa por um processo de biotransformação, ou seja, conversão, catalisada por enzimas, de um composto em uma forma mais solúvel em água e que assim possa ser excretado mais facilmente (VAN DER OOST et al., 2003). Esse processo ocorre, em maior quantidade no fígado e normalmente em duas fases. Na fase I (Fig. 1), o composto passa por reações de oxidação, redução e hidrólise, tornando-se um substrato adequado para as reações de fase II (MARTINEZ, 2006). As reações de fase I são catalisadas pelas enzimas do citocromo P450. Para peixes, a principal família de enzimas envolvidas nesse processo é a CYP-1A. Neste processo ocorrem várias reações de oxidação e redução que resultam na incorporação de um átomo de oxigênio, proveniente do oxigênio molecular, ao composto original, formando assim um composto que poderá ser excretado ou entrará na fase II da biotransformação.

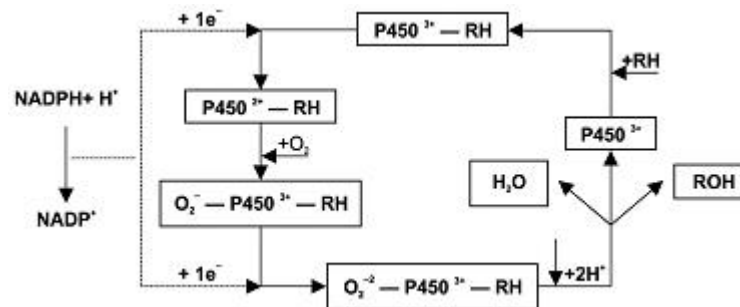


Figura 1 – O sistema do citocromo P450. $P450^{+3}$: citocromo P450 com o ferro no estado oxidado (Fe^{+3}); $P450^{+2}$: citocromo P450 com o ferro no estado reduzido (Fe^{+2}); RH: substrato/xenobiótico; e^- : elétron. Fonte: Martinez (2006), adaptado de Landis e Yu (1995).

As reações de fase II envolvem a conjugação do xenobiótico, na sua forma original ou seus metabólitos, com compostos endógenos, solúveis em água, presentes nas células em altas concentrações, e resultam no aumento da solubilidade na água e nas taxas de eliminação, reduzindo assim a toxicidade. Como as enzimas de fase II parecem ser influenciadas pela exposição a vários xenobióticos, existe grande interesse no seu uso como biomarcadores (MARTINEZ et al., 2004).

As glutathione S transferases (GST) constituem uma grande família de enzimas multifuncionais envolvidas na conjugação de xenobióticos e produtos da peroxidação lipídica ao tripeptídeo GSH. As GST's também são importantes na síntese de prostaglandinas e leucotrienos e na resistência ao câncer, pois vários produtos aldeídicos endógenos e muitas drogas utilizadas no tratamento que ativam a P450 podem danificar o DNA se não forem metabolizadas. São amplamente distribuídas em bactérias, fungos, plantas e animais, presentes no citosol e no núcleo celular. Existem quatro classes principais: alfa, mi, pi e teta, com duas classes menores sigma e kapa. Os ensaios em laboratório normalmente medem a atividade total da GST (HERMES-LIMA, 2004).

A atividade da GST é um bom biomarcador, pois essa enzima é relacionada com a detoxificação de xenobióticos. De acordo com a situação, sua atividade pode estar aumentada ou diminuída. Camargo et al. (2006) encontraram aumento da atividade da GST em curimbas em um rio contaminado. Monteiro et al. (2006) também observaram aumento da atividade desta enzima em *Brycon cephalus* expostos ao metil paration.

1.2.3 Defesas Antioxidantes

As defesas antioxidantes tem a função de neutralizar moléculas que apresentam grande capacidade reativa, normalmente moléculas com oxigênio, chamadas espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como ânion superóxido (O_2^-) e o radical hidroxil ($\cdot OH$). As EROs são formadas normalmente em função do metabolismo oxidativo de células aeróbias e devido ao seu grande poder oxidativo são rapidamente neutralizadas pelos antioxidantes. Além de enzimas, os animais contam também com antioxidantes não enzimáticos como vitamina E, vitamina C, carotenóides, e o tripeptídeo GSH (HERMES-LIMA, 2004).

A superóxido dismutase (SOD) é a primeira enzima da via antioxidante. Ela catalisa a reação entre o ânion superóxido e a água, formando peróxido de

hidrogênio. As SODs constituem uma família de quatro tipos de enzimas, composta por duas formas de cobre-zinco SOD (CuZn-SOD), uma intracelular e outra extracelular, uma forma de manganês SOD (Mn-SOD) e outra de ferro SOD (Fe-SOD). A CuZn-SOD é a mais abundante, estando presente no citosol e também nos lisossomos, peroxissomos, núcleo e mitocôndrias e distribuída em todos os tecidos. A Mn-SOD está localizada na mitocôndria e corresponde a aproximadamente 10% da atividade total da SOD. A Fe-SOD não é observada em animais, estando presente apenas em bactérias e algumas plantas. Os ensaios enzimáticos mais comumente empregados verificam normalmente a apenas a atividade da CuZn-SOD (HERMES-LIMA, 2004).

A atividade dessa enzima pode apresentar-se aumentada em animais expostos a contaminantes. Costa et al. (2008) encontraram um aumento de 81% na atividade da SOD no fígado e redução de 27% no músculo em girinos expostos a 1mg.L^{-1} de Roundup[®]. Monteiro et al. (2006) também observaram aumento da SOD no fígado do matrinxã, *Brycon cephalus*, expostos ao inseticida metil paration. Oruc et al (2004) em seu estudo com tilápias e carpas expostas ao inseticida 2,4-D e ao Azinfosmetil, também encontraram a atividade da SOD aumentada na brânquia dos animais.

As catalases (CAT) são enzimas que catalisam a quebra do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. Estão presentes nos peroxissomos, podendo estar em pequenas quantidades nas mitocôndrias do coração. Nos vertebrados, a CAT está presente em todos os tecidos, com alta atividade nos eritrócitos, fígado, rim e tecido adiposo, tendo baixa atividade no cérebro (HERMES-LIMA, 2004). A atividade da catalase pode estar aumentada ou diminuída nos animais expostos a xenobióticos (VAN DER OOST et al., 2003). Assim, a análise da toxicidade de um contaminante levando em conta apenas a CAT não é suficiente, sendo necessário sempre outro parâmetro bioquímico envolvido, tendo em vista que não existe relação direta entre sua inibição ou ativação.

Monteiro et al. (2006) observaram aumento da atividade da CAT em fígado de *Brycon cephalus* expostos ao metil paration. Já Costa et al. (2008) verificaram aumento da CAT no fígado e inibição no músculo de girinos expostos ao Roundup[®]. Em um estudo feito por Langiano et al. (2008) foi observado o aumento da atividade da

CAT em fígado de curimbas, *Prochilodus lineatus*, expostos ao Roundup® por 24 horas, enquanto que nos outros tempos, não houve alteração da atividade da enzima.

Uma outra peroxidase encontrada na via antioxidante é a glutathiona peroxidase (GPx), uma família de quatro tipos diferentes de enzimas selênio-dependentes. A GPx clássica catalisa a decomposição de vários hidroperóxidos orgânicos, inclusive o peróxido de hidrogênio, utilizando o tripeptídeo glutathiona (GSH) como co-substrato. Esta enzima está presente em todos os vertebrados, tendo maior atividade em órgãos com maior demanda energética como fígado, brânquias, rim, sendo excepcionalmente menos ativa no cérebro. O segundo tipo é uma GPx que age em peróxidos fosfolipídicos, estando presente na maioria dos tecidos, mas com atividade muito menor que a GPx clássica. O terceiro tipo é uma GPx plasmática, que é sintetizada principalmente no rim. O quarto tipo é a GPx gastrointestinal, presente no epitélio do trato gastrointestinal, relacionada com a defesa contra ingestão de hidroperóxidos (HERMES-LIMA, 2004). A maioria dos ensaios enzimáticos determinam a atividade da GPx clássica, cuja atividade pode ser induzida pela presença de determinados contaminantes, como mostrado por alguns estudos com animais expostos a diferentes contaminantes (ORUC et al., 2004; MONTEIRO et al., 2006; SANTOS et al., 2006).

A glutathiona reduzida (GSH) é o principal antioxidante não enzimático dos seres vivos, que atua como radical ou como substrato para enzimas degradando compostos tóxicos. Em cada caso, ela é oxidada a GSSH, que em condições normais é regenerada a GSH pela ação da glutathiona redutase (GR). Ocorrendo alterações de disponibilidade da GSH, a ação das enzimas relacionadas a ela (GST, GPx e GR) pode também ser alterada (HERMES-LIMA, 2004; MARAN et al., 2009).

1.2.4 Marcadores de Danos Oxidativos

Quando a produção de EROs é maior que a capacidade da célula em degradá-las, passamos a ter um quadro de estresse oxidativo. Nesta situação, pode-se

verificar inativação enzimática, danos ao DNA, peroxidação lipídica e por fim, morte celular. O processo de peroxidação lipídica é considerado a maior causa de injúria e morte celular. Basicamente, consiste de uma reação em cadeia, na maioria das vezes catalisada por metais de transição, que são oxidantes fortes causando a quebra dos ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) dos fosfolipídeos das membranas. O processo começa com a remoção de um átomo de hidrogênio dos PUFAs e o radical formado reage com um átomo de oxigênio formando o radical lipoperoxil. Este radical pode continuar a cadeia ou interagir com outro PUFAs, recomeçando a reação (HERMES-LIMA, 2004).

As EROs podem atacar enzimas e proteínas estruturais das células, levando a uma modificação oxidativa, e conseqüentemente, a diversos processos fisiológicos e patológicos (GLUSCZAK et al., 2007). Sabe-se que contaminantes como agrotóxicos podem induzir a formação de EROs, resultando em um desequilíbrio entre os mecanismos de defesa antioxidantes e a produção de pró-oxidantes. A peroxidação lipídica induzida por poluentes como pesticidas tem sido observada em várias espécies de peixes (AHMAD et al., 2006; GLUSCZAK et al., 2006 e 2007; MONTEIRO et al., 2006).

1.3 HERBICIDAS ROUNDUP[®] E ROUNDUP TRANSORB[®]

O Brasil é o quarto país do mundo e o primeiro da América Latina em consumo de agrotóxicos. Dentro do país, os estados de São Paulo, Minas Gerais e Paraná são os responsáveis pela metade do consumo total de agrotóxicos, e os herbicidas a base de glifosato se destacam como os mais utilizados. Atualmente, no Paraná o glifosato é herbicida mais utilizado; seu consumo no ano de 2000 representou 30% do consumo total de pesticidas (INQUE et al., 2003). Dentre os herbicidas a base de glifosato, o Roundup[®] é um dos mais utilizados.

O surgimento das culturas Roundup Ready[®] (RR) incentivou o aumento do uso deste herbicida. As culturas RR são compostas de plantas resistentes a ação do

Roundup[®], por terem recebido um gene de uma bactéria do solo resistente ao glifosato, *Agrobacterium* sp4. Sendo assim, o Roundup[®] é o único herbicida usado durante seu desenvolvimento. Atualmente, existem soja, algodão e milho do tipo RR. A liberação para o plantio dessas culturas e o crescente mercado para este tipo de sementes, levou a um aumento considerável da utilização deste herbicida, que pode chegar 200 milhões de litros anuais (AENDA, 2004).

A cultura de cana-de-açúcar, que está em plena expansão, também utiliza o Roundup[®]. Em 2003, a cultura da cana-de-açúcar respondeu por 8% da venda de agrotóxicos no Brasil, ocupando o 4º lugar no ranking nacional, movimentando 251 milhões de dólares. Armas et al. (2006) realizaram um levantamento na sub-bacia do rio Corumbataí, em São Paulo, sobre os agrotóxicos utilizados no plantio da cana, e constataram que o glifosato é o herbicida mais utilizado. Assim, com o incentivo da produção de álcool como combustível e a crescente exportação de açúcar, estima-se que o consumo de glifosato aumente junto com a expansão do plantio de cana de açúcar.

O glifosato é um herbicida do grupo das glicinas substituídas que é absorvido pelas folhas e caulículos novos e transportado por toda a planta, inibindo o metabolismo de aminoácidos (AMARANTE JR et al., 2002). Este herbicida inibe a ação da enzima 5-enol-piruvil-shiquimato-3-fosfato-sintase (EPSPS), que fica no cloroplasto, e é responsável por uma das etapas de síntese dos aminoácidos aromáticos essenciais fenilalanina, tirosina e triptofano, os quais são precursores de outros produtos como lignina, alcalóides, flavonóides e ácidos benzóicos. Assim, a planta tem a produção protéica inibida e conseqüentemente, inibição do seu crescimento. Os sintomas da ação do glifosato sobre as plantas incluem amarelamento dos meristemas, necrose e morte em dias ou semanas. Esta via bioquímica sobre a qual o glifosato atua não é encontrada nos animais e isso explica sua baixa toxicidade para animais (AMARANTE JR et al., 2002; GALLI; MONTEZUMA, 2005).

A degradação do glifosato ocorre principalmente por microorganismos do solo e da água, onde o glifosato é transformado em ácido aminometilfosfônico (AMPA) (Figura 02). Ghassemi et al. (1981) concluíram que a taxa de degradação em

água é geralmente menor, porque existem menos microrganismos na água que na maioria dos solos.

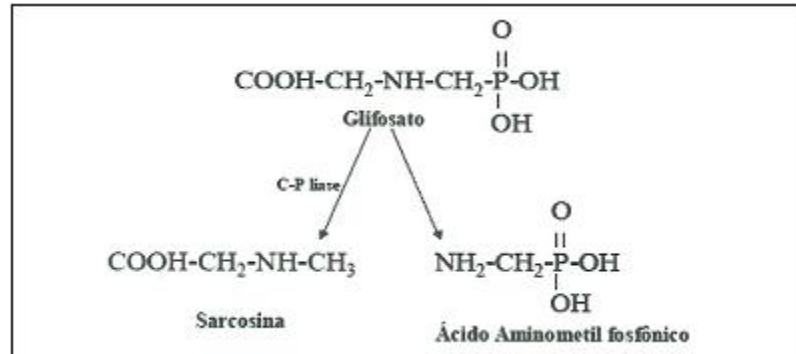


Figura 2 – Degradação do glifosato por bactérias do solo, com produção dos metabólitos: ácido aminometilfosfônico (AMPA) e sarcosina. Fonte: Dick e Quinn, 1995.

A toxicidade deste composto é considerada baixa, embora em ambientes aquáticos, a toxicidade do glifosato seja acentuada com o aumento da temperatura e do pH (AMARANTE Jr et al., 2002). Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO) a LD_{50} oral do glifosato puro em ratos é de 4230 mg/Kg. A CL_{50} do glifosato para a truta arco íris (*Oncorhynchus mykiss*) é entre 140 a 240 mg/L dependendo do tempo de exposição (GIESY et al., 2000).

Existem mais de 90 marcas comerciais de herbicidas contendo o glifosato como ingrediente ativo no mundo (HEAP, 1997). As formulações encontradas no mercado contêm em sua fórmula o sal de isopropilamina e o restante são ingredientes inertes, que atuam como solventes, surfactantes, conservantes e outras funções (BRAUSCH; SMITH, 2007). Os surfactantes têm a finalidade de aumentar a superfície de contato da gota do produto com a folha, atingindo mais pontos de permeabilidade e aumentando a aderência.

O Roundup[®] é um herbicida a base de glifosato (N-(fosfometil)glicina), que apresenta o princípio ativo na forma de sal de isopropilamina. É classificado como não-seletivo, sistêmico, para ser aplicado pós-emergência em diversas culturas, anuais e perenes, como soja, milho, café, citros, maçã, fumo, uva, cana-de-açúcar, pastagens

(GALLI; MONTEZUMA, 2005). É um herbicida de amplo espectro, servindo também para o controle de planta invasora aquática em lagos, canais e água corrente. É comumente usado em plantações de arroz e soja em concentrações de 0,36 a 2,16 mg.L⁻¹ (RODRIGUES; ALMEIDA, 2005). Possui grande solubilidade na água e meia vida de 30 a 90 dias, dependendo do tipo de solo e do nível de matéria orgânica (RODRIGUES; ALMEIDA, 2005). O Roundup[®] apresenta contém 48% de glifosato sob a forma de sal de isopropilamina e o amino polioxietileno (POEA) como surfactante, é classificado como pouco perigoso ao meio ambiente (classe IV) e é comercializado no Brasil desde 1984. O POEA aumenta a toxicidade do composto, por ser muito mais tóxico que o glifosato. Giesy et al. (2000), demonstraram que a CL₅₀ do Roundup[®] para truta arco-íris variou de 8,2 a 27 mg.L⁻¹, dependendo do tempo de exposição, enquanto que a do POEA variou de 0,65 a 7,4 mg.L⁻¹ e a do glifosato variou de 140 a 240 mg.L⁻¹, indicando que o composto é muito mais tóxico que o glifosato, sendo que a grande toxicidade aquática do Roundup[®] é atribuída ao POEA.

O Roundup Transorb[®] (RDT) contém 64,8% de glifosato, também na forma de sal de isopropilamina. O surfactante desta fórmula é um segredo da marca, sabe-se apenas que se trata de uma mistura de surfactantes contendo 15% de POEA e outras substâncias não divulgadas (HOWE et al., 2004), recebendo esta mistura a terminologia de tecnologia Transorb[®]. A diferença básica entre os dois produtos está relacionada com o tempo necessário para a ação do produto, com o RDT apresentando uma penetração muito mais rápida quando comparado ao Roundup[®]. O RDT foi desenvolvido para ser aplicado em condições de tempo ruim, ou seja, com grandes períodos de chuva. Este produto seria absorvido pela planta em apenas uma hora após a aplicação, enquanto que a outra formulação precisa de pelo menos, quatro horas para ser absorvido em quantidades suficientes. Diferentemente do Roundup[®], o Roundup Transorb[®] é classificado como perigoso ao meio ambiente (classe III) e é comercializado no Brasil desde 1998.

Estudos mostram que o Roundup Transorb[®] é muito mais tóxico que o RD. Santos et al. (2004), mostraram que bactérias do gênero *Bradyrhizobium* expostas a diferentes formulações de glifosato, apresentaram inibição de crescimento acima de 94% para o Roundup Transorb[®], enquanto que o Roundup[®] apresentou toxicidade bem

menor, inibindo aproximadamente 27% o crescimento. Essa toxicidade aumentada provavelmente não seja devida a mais alta concentração de glifosato do RDT, tendo em vista a baixa toxicidade deste componente, e sim ao surfactante da fórmula. Lorenzo et al. (2003), mostraram que o peixe *Aphanius iberus* não resiste a concentrações superiores a 40 mg.L^{-1} de Roundup Transorb[®], enquanto que tolera uma concentração dez vezes maior de Roundup[®]. Contudo, devido ao desconhecimento do surfactante utilizado e também pelo pouco tempo que o produto está no mercado, existem poucos estudos com a formulação RDT. Recentemente, foi lançado no mercado um novo produto chamado Roundup Ultra[®], que utiliza a chamada tecnologia Transorb 2[®], a qual seria uma mistura semelhante àquela encontrada no Roundup Transorb[®]. Esse fato demonstra que estes produtos provavelmente terão seu uso incentivado, mesmo que não haja dados sobre a toxicidade destas substâncias, nem ao menos o conhecimento do que está sendo lançado no ambiente.

Assim, apesar do crescente aumento do consumo do herbicida Roundup Transorb[®], a literatura sobre suas propriedades toxicológicas e ecotoxicológicas ainda é escassa. Mesmo considerando o Roundup[®], os estudos já realizados foram feitos principalmente com espécies de ambiente temperado, sendo poucos com espécies tropicais. Além disso, não há estudos que integram vários parâmetros bioquímicos em um mesmo trabalho. Portanto, mais estudos de avaliação dos efeitos dos pesticidas da família Roundup são necessários para uma melhor compreensão das vias de atuação destes produtos e os perigos que eles representam para o meio ambiente.

1.4 CURIMBA (*PROCHILODUS LINEATUS*)

O curimba (*Prochilodus lineatus*) (VALENCIENNES, 1847) (Fig. 3) é uma espécie neotropical de água doce, pertencente à ordem Characiformes, família Prochilodontidae. Esta espécie é uma das mais abundantes e importantes da região Sul e Sudeste do Brasil, sendo bastante utilizada na alimentação humana (MARTINEZ;

SOUZA, 2002). A principal característica da família Prochilodontidae é a boca protrátil em forma de ventosa, com lábios carnosos, sobre os quais estão implantados numerosos dentes diminutos dispostos em fileiras. As escamas são ásperas e a coloração é prateada. Os curimbas podem alcançar de 30 a 80 cm de comprimento total e realizam longas migrações reprodutivas. São capturados em grandes cardumes, sendo espécies importantes comercialmente, principalmente para as populações de baixa renda.

Por se tratar de uma espécie de fundo e detritívora, os espécimes de *P. lineatus* são muito suscetíveis à contaminação, pois podem incorporar poluentes presentes tanto na água como no sedimento. Estes peixes apresentam grande importância para estudos ecotoxicológicos, pois tem se mostrado sensíveis a diversas classes de poluentes ambientais, sendo considerado um potencial bioindicador para o monitoramento ambiental. Possuem ainda uma biologia bastante conhecida e são utilizados em muitos trabalhos da área (MARTINEZ et al., 2004; CAVALCANTI et al., 2008; LANGIANO; MARTINEZ, 2008).



Figura 3 – Exemplar jovem de curimba, *Prochilodus lineatus*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos agudos de dois herbicidas à base de glifosato, Roundup® e Roundup Transorb®, para a espécie de peixe nativa *Prochilodus lineatus*, por meio da análise de biomarcadores bioquímicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar testes de toxicidade aguda (6, 24 e 96h) com exemplares jovens de *P. lineatus* expostos a dois diferentes produtos comerciais a base de glifosato: Roundup® e Roundup Transorb®;
- Avaliar se os herbicidas alteram a atividade cerebral e muscular da acetilcolinesterase;
- Avaliar se os herbicidas interferem na atividade hepática de uma enzima de biotransformação (glutathione transferase);
- Avaliar se os herbicidas alteram a atividade hepática de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase) e o conteúdo hepático de antioxidante não enzimático (glutathione reduzida);
- Avaliar se os herbicidas promovem danos oxidativos no fígado (peroxidação lipídica);
- Comparar os efeitos dos dois herbicidas com base nos biomarcadores analisados em *P. lineatus*.

3 ARTIGO 1

A exposição aguda ao Roundup[®] promove estresse oxidativo e inibição da acetilcolinesterase no peixe *Prochilodus lineatus*

Kathya Assmann Modesto e Cláudia B. R. Martinez

Artigo a ser submetido para publicação na revista Comparative Biochemistry and Physiology, Part C

A exposição aguda ao Roundup[®] promove estresse oxidativo e inibição da acetilcolinesterase no peixe *Prochilodus lineatus*

Kathya Assmann Modesto e Cláudia B.R. Martinez*

Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil. C.P. 6001. CEP 86051-990.

*corresponding author. Tel.: +55-43-33714650; fax: +55-43-33714207; E-mail address: cbueno@uel.br (C. B. R. Martinez).

RESUMO

O Roundup[®], cujo princípio ativo é o glifosato, é um dos herbicidas mais utilizados no mundo. Neste trabalho foram avaliados os efeitos deste herbicida para o peixe neotropical *Prochilodus lineatus* através da análise da atividade hepática das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx e GST, quantidade de GSH, ocorrência de lipoperoxidação (TBARs) e atividade da AChE no cérebro e músculo. Juvenis de *P. lineatus* foram expostos a 10 mg.L⁻¹ de Roundup[®] (RD) ou apenas a água (CTR) por 6, 24 e 96h e amostras de fígado, cérebro e músculo foram coletadas. Após 24h de exposição ao RD os peixes apresentaram redução na atividade da SOD e GPx e aumento no conteúdo de GSH, em relação aos respectivos CTR. Após 24 e 96h os peixes dos grupos RD apresentaram aumento na atividade da GST e peroxidação lipídica em relação aos dos CTR. A atividade da AChE foi inibida no cérebro após 96h e no músculo após 24 e 96h de exposição. Estes resultados mostram que a exposição aguda ao Roundup[®] promove a estimulação da biotransformação(GST), interfere nas defesas antioxidantes do animal levando a ocorrência de peroxidação lipídica, além de inibir a acetilcolinesterase, tanto no cérebro quanto no músculo de *P. lineatus*.

Palavras-chave: Acetilcolinesterase. Biomarcadores. Estresse oxidativo. Glifosato. Peixe. *Prochilodus lineatus*. Roundup[®].

1 Introdução

Atualmente, dentre os herbicidas mais utilizados destaca-se o glifosato, que pertence ao grupo químico das glicinas substituídas e é classificado como não-seletivo e de ação sistêmica. Este pesticida apresenta largo espectro de ação, o que possibilita o controle de plantas invasoras anuais e perenes (GALLI; MONTEZUMA, 2005). O glifosato é considerado pouco tóxico pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2004), não é bioacumulável em animais terrestres e aquáticos e é amplamente usado no mundo devido a sua alta eficiência, baixo custo e o fato de ser rapidamente degradado pelo meio ambiente (GIESY et al., 2000). Entretanto, uma das mais conhecidas formulações comerciais a base de glifosato, que é o Roundup[®], é considerada mais tóxica, devido à adição do surfactante amino polioxietileno (POEA) ao produto (AMARANTE et al., 2002). A maior toxicidade do POEA, quando comparada ao ingrediente ativo glifosato, já foi mostrada em alguns trabalhos para diferentes organismos (TSUI; CHU, 2003; WANG et al., 2005; CONTARDO-JARA et al, 2009). O POEA é uma substância não-iônica usada na formulação do herbicida para aumentar a eficácia de seu ingrediente ativo, o glifosato, promovendo a penetração deste na cutícula da planta (BRAUSCH; SMITH, 2007). O Roundup[®] é um dos herbicidas mais utilizados no mundo (Jiraungkoorskul et al., 2002), e o rápido aumento de seu uso na agricultura deve-se ao cultivo de culturas geneticamente modificadas (Roundup Ready[®]) para tolerar este herbicida (GIESY et al., 2000). Além disso, no Brasil, a expansão da cultura de cana de açúcar também tem contribuído para o aumento do consumo de Roundup[®], tendo em vista que ele é o principal herbicida utilizado no plantio desta cultura (ARMAS, 2006).

Devido à elevada solubilidade do Roundup[®] na água e seu extenso uso no ambiente aquático, como em sistemas de águas rasas, como as culturas de arroz, e para o controle de macrófitas aquáticas (CARVALHO et al. 2005), os efeitos deste herbicida para organismos aquáticos precisam ser melhor conhecidos (TSUI; CHU, 2003). Alguns estudos já mostraram que o Roundup[®] é tóxico para peixes e pode promover alterações morfo-funcionais nestes animais. Jiraungkoorskul et al (2002) mostraram que a exposição ao Roundup[®] induz alterações histológicas em brânquias,

fígado e rim da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*. Para os peixes neotropicais *Leporinus obtusidens* e *Rhamdia quelen* a exposição ao Roundup® inibiu a atividade da acetilcolinesterase cerebral e gerou alterações metabólicas (GLUSCZAK et al., 2006 e 2007). Alguns autores também já mostraram que o Roundup® pode ser genotóxico do para peixes. Çavas e Könen (2007) observaram que *Carassius auratus* expostos ao herbicida apresentaram aumento dose dependente nas frequências de micronúcleos, de anormalidades nucleares e de quebras no DNA. Para a espécie de peixe neotropical *Prochilodus lineatus*, exposições agudas à concentrações subletais de Roundup® promoveram alterações metabólicas associadas à resposta de estresse e alterações histológicas no fígado (LANGIANO; MARTINEZ, 2008) e também danos no DNA (CAVALCANTE et al., 2008). Entretanto, para a melhor compreensão das possíveis ações tóxicas deste herbicida em peixes, mais informações sobre seus efeitos são necessárias.

Muitos xenobióticos, como os pesticidas, podem produzir espécies reativas de oxigênio (EROs) através de alguns mecanismos, como interferência no transporte de elétrons na membrana mitocondrial e subsequente acúmulo de intermediários reativos, inativação de enzimas antioxidantes, depleção de antioxidantes não enzimáticos e peroxidação de lipídeos de membrana (WINSTON; DI GIULIO, 1991). A produção de EROs associada a presença de poluentes e o estabelecimento de estresse oxidativo têm sido indicado como um possível mecanismo de toxicidade em organismos aquáticos expostos a pesticidas (OROPESA et al., 2008).

O equilíbrio entre as defesas antioxidantes e a geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) é fundamental para a homeostase do animal. Quando há um desbalanço entre pró-oxidantes e defesas antioxidantes pode ser estabelecida a situação denominada estresse oxidativo, na qual o excesso de geração de EROs pode levar a danos irreversíveis no DNA e outras macromoléculas e até a morte (AHMAD et al., 2000). Os danos aos lipídeos de membrana, a lipoperoxidação, é considerada a maior causa de injúria e morte celular e pode ser induzida por poluentes como herbicidas (GLUSCZAK et al., 2006). A superóxido dismutase (SOD) é a primeira enzima na linha de defesa antioxidante e é responsável por catalisar a conversão do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio é então

degradado em água e oxigênio molecular pela catalase (CAT), uma família de enzimas presente principalmente nos peroxissomos. Outra peroxidase bastante importante é a glutathiona peroxidase (GPx), que metaboliza uma variedade de peróxidos, inclusive o peróxido de hidrogênio. Dentre os antioxidantes não-enzimáticos, destaca-se a glutathiona reduzida (GSH) que atua como principal antioxidante da célula e é co-fator para a ação GST e GPx (HERMES LIMA, 2004; MARAN et al., 2009). A glutathiona-S-transferase (GST) é uma enzima que atua no processo de biotransformação, catalisando a conjugação de uma variedade de metabólitos, dentre eles xenobióticos, e produtos da peroxidação lipídica com o tripeptídeo GSH, transformando o composto tóxico em uma forma mais facilmente excretável.

A inibição da atividade da acetilcolinesterase (AChE) é um efeito reconhecido dos inseticidas a base de carbamatos e organofosforados para peixes (MONSERRAT et al., 2002), mas a determinação desta enzima em diferentes tecidos de peixes também tem se mostrado um método sensível para detectar a presença de alguns herbicidas (SANCHO et al., 2000). Peixes da espécie *R. quelen* apresentaram redução significativa na atividade da AChE após exposição ao Roundup® (GLUSCZAK et al., 2007). Quando a atividade desta enzima é reduzida, a acetilcolina não é quebrada e fica acumulada nas sinapses, alterando todo o funcionamento normal do sistema nervoso (DUTTA; ARENDS, 2003), podendo afetar a locomoção e o equilíbrio de organismos expostos (BRETAUD et al., 2000).

Assim, o objetivo deste trabalho foi adicionar elementos para a compreensão da ação tóxica do Roundup® para peixes. Para tanto, foram avaliadas a atividade hepática das enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx e GST), a quantidade de GSH no fígado, ocorrência de lipoperoxidação (Ensaio T-BARs) e a atividade da AChE em cérebro e músculo de *P. lineatus* após a exposição aguda de à uma concentração subletal de Roundup®.

2 Materiais e Métodos

2.1 Animais

Exemplares jovens de *Prochilodus lineatus* (n: 72, comprimento total de $10,0 \pm 1,03$ cm e peso de $10,9 \pm 3,0$ g) fornecidos pela EPUEL (Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina/PR), foram aclimatados por uma semana em tanques de 300L, com água desclorada e aerada. Durante esse período foram alimentados a cada 48h com ração comercial contendo 36% de proteína e não receberam alimentação 48h antes de serem expostos ao composto e durante os testes de toxicidade.

2.2 Testes de Toxicidade

Para os testes de toxicidade aguda, os animais foram colocados em aquários de 100L contendo água desclorada e continuamente aerada, em uma densidade de seis animais por aquário. Um grupo de peixes foi exposto somente a água (controle) e outro exposto a água contendo 10 mg.L^{-1} de Roundup[®] (360 g glifosato.L⁻¹ or 41% de glifosato, Monsanto do Brasil LTDA). Essa concentração corresponde a 75% do valor da CL₅₀-96h de Roundup[®] determinada para *P. lineatus* (LANGIANO; MARTINEZ, 2008). Os testes realizados foram do tipo estático, com duração de 6, 24 e 96 h. Todos os experimentos foram feitos com réplicas. Durante os experimentos foram monitorados: temperatura, oxigênio dissolvido, condutividade e pH do água dos aquários.

Imediatamente após serem retirados dos aquários, os peixes foram anestesiados com benzocaína ($0,1\text{g.L}^{-1}$) e em seguida, mortos por secção medular. Após os peixes serem medidos e pesados; o fígado, o cérebro e o músculo foram retirados com auxílio de material de dissecação e mantidos congelados a 80°C negativos até o momento dos ensaios.

2.3 Enzimas antioxidantes

Os fígados foram pesados, homogeneizados (10X volume) em tampão fosfato de potássio 0,1M, centrifugados (20 min, 15000 g, 4°C) e o sobrenadante foi separado

para análises dos parâmetros bioquímicos. A atividade da glutathione-S-transferase (GST) foi determinada de acordo com a metodologia de Keen et al. (1976), seguindo-se a complexação da glutathione reduzida (GSH) com o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), em 340 nm, e expressa em nmol CDNB conjugados. min^{-1} . mg de proteína⁻¹. A atividade da cobre-zinco superóxido dismutase (CuZn-SOD) foi determinada pelo método de Flohé e Otting (1984), que se baseia na medida da inibição da taxa de redução do citocromo c pelo radical superóxido em 550 nm e foi expressa em U SOD. mg de proteína⁻¹, sendo que uma U de SOD corresponde a quantidade de enzima que promove a inibição de 50% da taxa de redução do citocromo c. A atividade da catalase (CAT) foi determinada de acordo com a técnica descrita por Beutler (1975), seguindo-se a velocidade de decomposição da H₂O₂, através do decréscimo de absorvância em 240 nm, e a atividade foi expressa em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$. A atividade da glutathione peroxidase selênio dependente (Se-GPx) foi determinada pelo método de Hopkins e Tudhope (1973), baseado na oxidação do NADPH em presença de H₂O₂ em 340nm, e expressa em $\mu\text{mol NADPH oxidado} \cdot \text{min} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$.

2.4 Antioxidante não enzimático

A concentração de glutathione reduzida (GSH) foi determinada pela reação da glutathione com o 5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico (DTNB), formando o tiolato (TNB) de cor amarelada, em 412 nm e expressa em $\mu\text{g de GSH} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$, através de uma curva padrão de GSH.

2.5 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica no fígado dos peixes foi estimada pela produção de malondialdeído (MDA), que é um dos produtos finais da peroxidação lipídica. O conteúdo de MDA foi determinado através do ensaio TBARS, que mede as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA), em 530 nm, de acordo com a metodologia descrita por Satoh (1978). A lipoperoxidação foi expressa em equivalentes de malondialdeído (MDA) como $\mu\text{mol MDA} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$, usando uma curva padrão de MDA.

2.6 Acetilcolinesterase

Os cérebros e os músculos foram homogeneizados (10X volume) em tampão fosfato de potássio (0,1M, pH 7,5), e centrifugados (20 min, 10000 g, 4°C) e o sobrenadante foi retirado para as análises. A atividade da enzima foi determinada com base no método colorimétrico de Ellman et al. (1961) adaptado para leitura em microplaca, de acordo com Alves Costa et al. (2007). A concentração final do substrato iodeto de acetilcolina utilizada foi de 9 mM e do reagente de cor DTNB foi de 0.5 mM, para ambos os tecidos. A absorbância foi determinada em leitora de microplacas em 415 nm e a atividade da enzima expressa em nmol DTNB.min.mg prot⁻¹.

A concentração de proteínas de todas as amostras, em todos os ensaios enzimáticos, foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951), usando albumina bovina como padrão.

2.7 Análise Estatística

Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão. Para todos os parâmetros analisados, as diferenças entre os grupos controles e experimentais para cada tempo experimental foram analisadas pelo teste t de student ou Mann-Whitney, dependendo da distribuição dos dados e homogeneidade das variâncias. Foram considerados significativos valores de $P < 0,05$.

3 Resultados

Durante os testes de toxicidade não houve mortalidade de peixes. Durante a aclimação e os experimentos, os parâmetros físico-químicos da água mantiveram-se constantes (Tabela 1).

Tabela 1 – Parâmetros físicos e químicos da água durante o período de aclimação e durante a realização dos testes de toxicidade nos diferentes tempos experimentais, tanto para os grupos expostos apenas à água (Controle), quanto para os grupos expostos ao Roundup®.

	Temperatura (°C)	pH	OD (mgO ₂ .L ⁻¹)	Condutividade (µS.cm ⁻¹)	Dureza (mg CaCO ₃ .L ⁻¹)
Aclimação	23,0 ± 2,3	6,84 ± 1,0	6,8 ± 0,2	65,2 ± 0,8	44
Controle	25,7 ± 0,5	7,4 ± 0,2	6,9 ± 0,8	53,7 ± 10,4	44
Experimental	25,0 ± 0,0	7,4 ± 0,1	7,0 ± 0,8	62,8 ± 4,4	44

Os valores correspondem à média ± EP. A dureza da água foi determinada apenas uma vez para cada situação experimental.

Os resultados referentes às defesas antioxidantes estão apresentados na Figura 1. Os peixes expostos ao herbicida, durante 24h, apresentaram redução significativa na atividade hepática da SOD e por 6 e 24h da GPx, acompanhado de um aumento significativo no conteúdo da GSH, quando comparados com os respectivos controles. Após 24 e 96h de exposição ao Roundup® os peixes apresentaram aumento significativo na atividade da GST, em relação aos respectivos controles. Os animais não mostraram alterações significativas na atividade da catalase em nenhum dos períodos de exposição ao Roundup®.

Os resultados do ensaio TBARS, para determinação do conteúdo de MDA e estimativa da peroxidação lipídica no fígado dos peixes submetidos ao testes de toxicidade estão apresentados na Tabela 2. Verificou-se, em todos os tempos experimentais um aumento do conteúdo de MDA, entretanto, em virtude da elevada variabilidade dos dados, as diferenças não foram comprovadas estatisticamente. Mesmo assim, vale ressaltar que os valores de P obtidos para as análises de 24 e 96 h, respectivamente 0,068 e 0,057, estão muito próximos do valor de significância estabelecido ($P < 0,05$), mostrando uma forte tendência no aumento do conteúdo de MDA.

Tabela 2 – Conteúdo de malondialdeído (em $\mu\text{mol MDA. mg proteína}^{-1}$) no fígado de *Prochilodus lineatus* expostos somente a água (Controle) ou a 10mg.L^{-1} de Roundup® (Roundup), por diferentes tempos experimentais (6, 24 e 96h). Os valores de P obtidos na comparação estatística entre os grupos controle e Roundup, para cada tempo experimental, estão apresentados na coluna da direita.

Tempo	Controle	Roundup	Valores de P
6h	$25,95 \pm 5,65$ (5)	$31,81 \pm 10,65$ (5)	0,640 ^a
24h	$21,61 \pm 5,02$ (5)	$43,55 \pm 9,08$ (5)	0,068 ^a
96h	$13,40 \pm 0,97$ (5)	$38,27 \pm 10,84$ (6)	0,057 ^b

^a valor de P obtido no teste t de student; ^b valor de P obtido no teste de Mann-Whitney

A atividade da enzima acetilcolinesterase apresentou redução significativa no cérebro dos peixes após 96h de exposição ao Roundup®, em relação ao seu respectivo controle. No músculo, a atividade da enzima também foi inibida após 24 e 96h de exposição dos peixes ao Roundup®, em relação aos respectivos controles (Fig. 2)

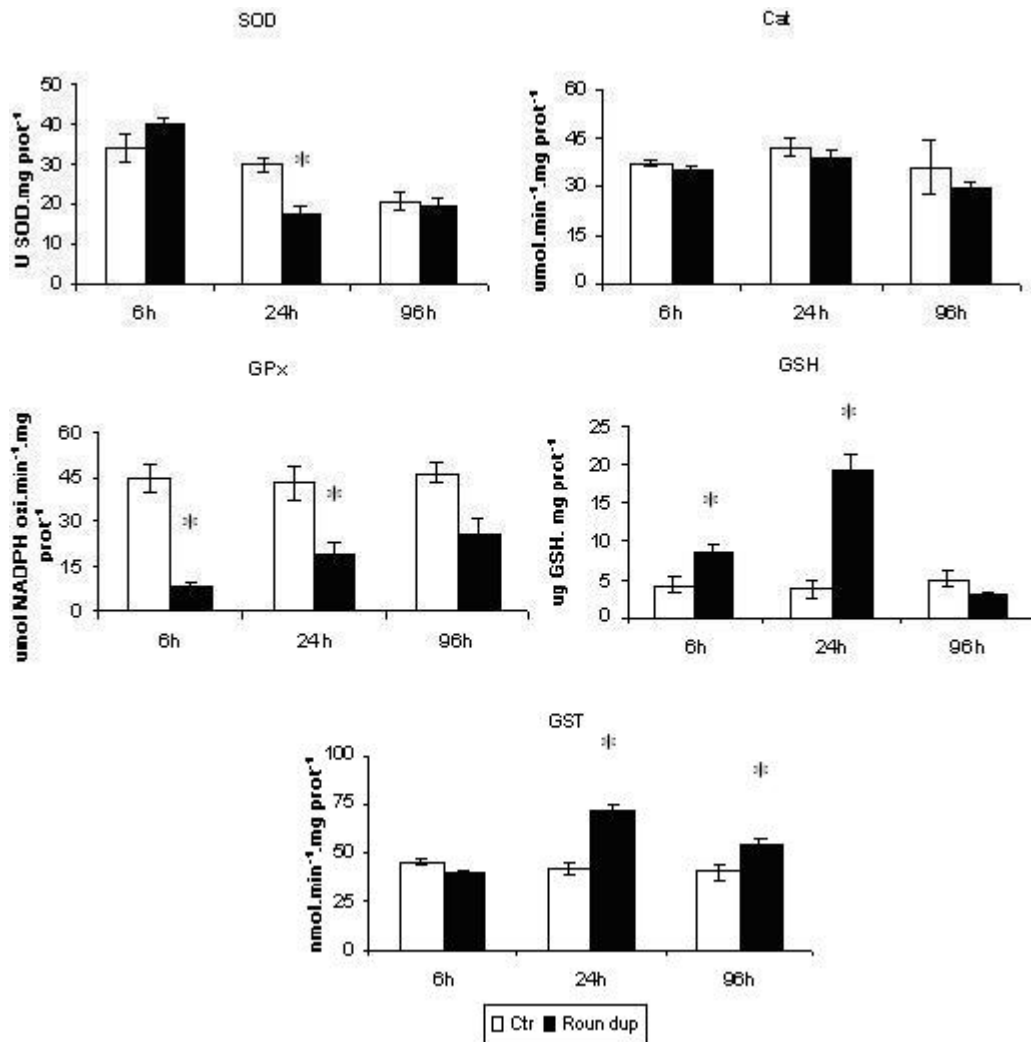


Figura 1 – Atividade hepática das enzimas SOD, CAT, GPx, GST e concentração de GSH no fígado de *Prochilodus lineatus* expostos a 10mg.L⁻¹ de Roundup® (Roundup) ou somente a água (Ctr), por diferentes tempos experimentais (6, 24 e 96h). As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão (n: 5-6) * indica diferença significativa em relação ao respectivo controle (P<0,05).

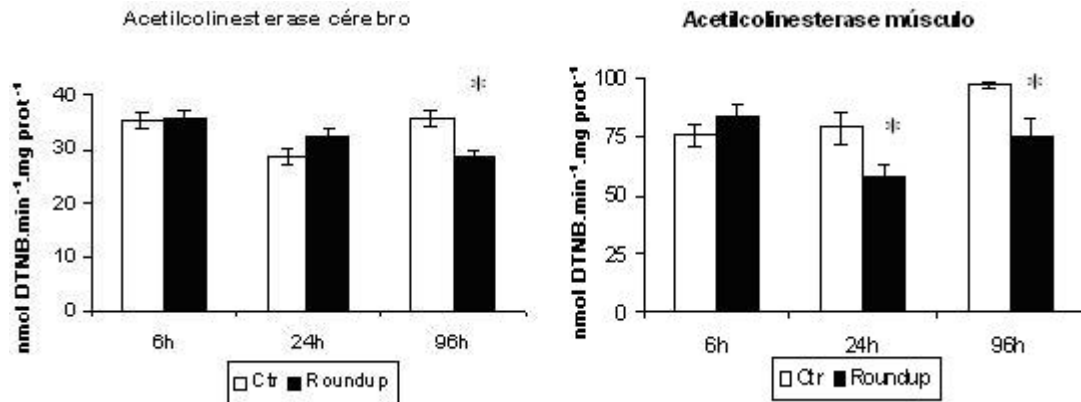


Figura 2 – Atividade da acetilcolinesterase no cérebro e no músculo de *Prochilodus lineatus* expostos a 10mg. L⁻¹ de Roundup® ou somente a água (Ctr) por diferentes tempos (6, 24 e 96h). As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão (n: 6). *indica diferença significativa em relação ao respectivo controle (p<0,05).

4 Discussão

Neste trabalho um conjunto de parâmetros de estresse oxidativo de uma espécie de peixe neotropical foi determinado para adicionar elementos para a compreensão dos possíveis mecanismos de toxicidade do herbicida Roundup®. Existem alguns estudos que já analisaram os efeitos do Roundup® sobre alguns desses parâmetros isoladamente (GLUSCZAK et al., 2006, 2007; LANGIANO; MARTINEZ, 2008), mas no presente estudo verificou-se, de maneira integrada, as possíveis alterações nas defesas antioxidantes e ocorrência de lesões oxidativas após a exposição de uma espécie de peixe ao Roundup®. De modo geral, os resultados mostraram que o herbicida estimula a via de biotransformação, mas reduz a atividade de algumas enzimas antioxidantes, e leva a ocorrência de peroxidação lipídica. Além disto, o herbicida mostrou atividade anticolinesterásica tanto no cérebro quanto no músculo.

Quando se analisa a atividade das enzimas antioxidantes, deve-se considerar que existe uma via complexa de regulação destas enzimas e que suas atividades resultam de dois processos: produção e inativação. A carbonilação de proteínas, devido a ação direta de espécies reativas de oxigênio (EROs), pode causar perda de atividade enzimática, assim como alguns produtos de peroxidação lipídica podem reagir com resíduos de aminoácidos, alterando a função da proteína. Sendo assim, muitas das

enzimas envolvidas no processo de defesa antioxidante também podem ser inativadas pelo excesso de oxidantes, e muitas vezes este oxidante pode ser seu próprio substrato. A superóxido dismutase (SOD), por exemplo, pode ser inativada pelo peróxido de hidrogênio, a catalase pelo ânion superóxido e a glutathione S-transferase (GST) é facilmente inativada por oxidantes em geral (BAGNYUKOVA et al., 2006). Neste estudo, a inibição da SOD após 24h de exposição ao Roundup® pode ter sido provocada pelo acúmulo transitório de peróxido de hidrogênio no fígado dos peixes. Como a CAT não teve sua atividade alterada após a exposição ao Roundup®, pode-se supor que houve um acúmulo de peróxido de hidrogênio nas células. O peróxido de hidrogênio é um forte oxidante que pode ter vários destinos dentro da célula. O H₂O₂ pode ser metabolizado pela Cat ou pela GPx, gerando H₂O e O₂; se não for metabolizado, o peróxido de hidrogênio pode gerar radicais hidroxil ([•]OH) através da reação de Fenton, que é a mais reativa das EROS e reage com lipídeos das membranas plasmáticas das células (HERMES LIMA, 2004). A GPx, que também poderia metabolizar este peróxido também teve sua atividade reduzida após 6 e 24h de exposição ao herbicida, contribuindo para o acúmulo de H₂O₂, que pode então ter levado a redução da atividade da SOD após 24 horas de exposição.

A manutenção da atividade da catalase (CAT) observada neste trabalho em todos os tempos experimentais está de acordo com os resultados encontrados por Gluszczak et al. (2007), que também não observaram alterações na atividade desta enzima no fígado de *Rhandia quelen* expostos a 0,2 e 0,4 mg.L⁻¹ do Roundup® por 96 horas. A atividade da CAT pode ser aumentada ou diminuída em ambientes contaminados ou após a exposição a poluentes, dependendo do agente químico em questão. Moraes et al. (2007) encontraram aumento da atividade da CAT no fígado de *Leporinus obtusidens* expostos aos herbicidas clomazone e propanil. Pereira Maduenho e Martinez (2008) também observaram aumento da CAT em fígado de *P. lineatus* expostos ao diflubenzuron. Ao contrário, Crestani et al. (2006), mostraram redução da atividade hepática da catalase em *R. quelen* expostos ao clomazone. Os resultados encontrados na literatura sobre a atividade dessa enzima são muito variados e podem ser explicados considerando-se que o potencial antioxidante dos peixes muda de acordo com a espécie e o seu habitat (GLUSCZAK et al., 2007). Por essa razão, a

utilização da atividade da catalase como biomarcador exclusivo de toxicidade não é recomendada, sendo necessária a verificação da atividade de diferentes enzimas para a compreensão do processo (VAN DER OOST et al., 2003). Sendo assim, apesar da CAT não ter mostrado alteração de sua atividade neste trabalho, a hipótese de que a exposição ao Roundup® gere EROS não pode ser descartada, pois outras enzimas da via antioxidante mostraram alteração após a exposição ao produto.

A redução na atividade da GPx observada após 6 e 24 horas de exposição pode estar relacionada com a disponibilidade do tripeptídeo GSH. A GSH também atua como o principal antioxidante não enzimático das células, além de ser substrato para a atividade da GST e da GPx, assim, dependendo da situação, pode haver falta do tripeptídeo para algum desses processos (MONTEIRO et al., 2006). No tempo experimental de 6 e 24h além da concentração da GSH estar aumentada, a atividade da GST também está estimulada em 24h. Assim, pode-se supor que a GSH esteja sendo utilizada prioritariamente como antioxidante e substrato para a GST, reduzindo portanto a disponibilidade de substrato para a atuação da GPx.

Tanto a GST como a GPx contribuem para a detoxificação de produtos do estresse oxidativo, sendo a contribuição da GST mais significativa que a da GPx (MARAN et al., 2008). Tem sido demonstrado que a atividade da GST pode estar alterada em locais poluídos, e que a presença de contaminantes orgânicos podem levar ao aumento da atividade desta enzima (MACHALA et al., 1997). Neste trabalho, o aumento observado da atividade da GST após 24 e 96 horas de exposição, deve-se provavelmente ao aumento do processo de biotransformação do xenobiótico pelo animal exposto ao Roundup®, podendo estar ocorrendo também a metabolização dos lipoperóxidos formados na reação de Fenton, indicando a ativação dos mecanismos de defesa. Esse aumento da atividade enzimática condiz com o resultado encontrado por Cavalcanti et al. (2008), que observaram aumento dos danos no DNA, através do ensaio Cometa, de eritrócitos de *P. lineatus* expostos a 10 mg.L⁻¹ de Roundup® por 96 horas. Ou seja, mesmo com o aumento da atividade da GST, a via de defesa não é suficiente para eliminar os produtos do contaminante, que acabam por gerar danos ao DNA do animal.

Outra consequência da insuficiência das vias antioxidantes é a peroxidação lipídica, que se apresenta como um dos principais indicativos de estresse oxidativo (FALFUSHYNSKA; STOLYAR, 2009), que pode ser gerado em diversos tecidos de peixes após a exposição a poluentes, como os herbicidas (AHMAD et al., 2004; MIRON et al., 2008). No presente estudo a ocorrência de peroxidação lipídica foi indicada pelo aumento na concentração de MDA no fígado de *P. lineatus* após a exposição ao Roundup® por 24 e 96 horas. A elevação nos níveis de MDA também já foi descrita em músculo do peixe *R. quelen* após 96 horas de exposição a 0,2 e 0,4 mg.L⁻¹ de Roundup® (GLUSCZAK et al., 2007). O Roundup® também induziu peroxidação lipídica no fígado e no músculo esquelético de girinos de rã touro (*Lithobates catesbeiana*) após 48 horas de exposição a 1 mg.L⁻¹ do herbicida (COSTA et al., 2008). Esses autores sugeriram que a geração de espécies reativas de oxigênio e o estresse oxidativo estão envolvidos na toxicidade induzida pelo Roundup® e os resultados do presente trabalho reforçam essa idéia.

A redução observada neste estudo na atividade da acetilcolinesterase (AChE) no cérebro e no músculo após 96 horas de exposição, concorda com o resultado encontrado em cérebro de *L. obtusidens* e *R. quelen* expostos ao mesmo herbicida (GUSCZAK et al., 2006 e 2007). Mas este é o primeiro relato da inibição da AChE no músculo de peixes expostos ao Roundup®. Existem vários trabalhos que relacionam a atividade desta enzima com diferentes espécies e contaminantes (MIRON et al., 2005; ÜNER et al., 2006; RODRÍGUEZ-FUENTES et al., 2007; PEREIRA MADUENHO; MARTINEZ, 2008; FAFUSHYNSKA; STOLYAR, 2009), tendo em vista que a sensibilidade da AChE é variável entre as espécies, sendo o cérebro e o músculo os tecidos mais utilizados nos ensaios (SANCHO et al., 2000). O acúmulo de acetilcolina devido a redução da atividade enzimática pode afetar a fuga e o comportamento reprodutivo dos peixes (SAGLIO; TRIJASSE, 1998; BRETAUD et al., 2000), interferindo diretamente na sobrevivência da espécie.

Os resultados do presente estudo mostraram que a exposição aguda ao Roundup® estimulou a via de biotransformação, com o aumento da atividade da GST, mas interferiu nas defesas antioxidantes de *P. lineatus*, com a redução da atividade da SOD e da GPx. As defesas do animal não foram suficientes para neutralizar as EROS,

produzidas provavelmente durante o processo de biotransformação, levando a ocorrência de peroxidação de lipídeos de membrana, indicando que a exposição ao herbicida gera uma situação de estresse oxidativo. Além disso, a inibição da AChE cerebral e muscular mostra que o Roundup[®] atua como um contaminante de ação anticolinesterásica.

Referências

Ahmad, I., Hamid, T., Fatima, M., Chand, H.S., Jain, S.K., Athar, M., Raisudin, S., 2000. Raisuddin, S. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus Bloch*) is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Biochim. Biophys. Acta.* 1523, 37–48.

Ahmad, I., Pacheco, M., Santos, M.A., 2004. Enzymatic and enzymatic antioxidants as an adaptation to phagocytes induced damage in *Anguilla anguilla* L following in situ harbour water exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 57, 290–295.

Alves Costa, J.R.M., Mela, M., Silva de Assis, H.C., Pelletier, E., Randi, M.A.F., Oliveira Ribeiro, C.A., 2007. Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 67, 82-88.

Amarante Jr., O.P., Santos, T.C.R., Brito, N.M., Ribeiro, M.L., 2002. Glifosato: Propriedades, toxicidade, uso e legislação. *Quím. Nova.* 25, 589–593.

Armas E.D., 2006. Biogeodinâmica de herbicidas utilizados em cana-de-açúcar (*Saccharum ssp.*) na sub-bacia do rio Corumbataí. Tese (Doutorado em Ecologia de Agroecossistemas) – Universidade de São Paulo, 187 p.

Bagnyukova T. V., Chahrak O. I., Lushchak V. I., 2006. Coordinated response of goldfish antioxidant defenses to environmental stress. *Aquat. Toxicol.* 78 ,325–331

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

Brausch, M.J., Smith, N.P., 2007. Toxicity of three polyethoxylated tallowamine surfactant formulations to laboratory and field collected fairy shrimp, *Thamnocephalus platyurus*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 52, 217–221.

Brethead, S., Toutant, J.P., Saglio, P., 2000. Effects of carbofuran, diuron and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*). Ecotoxicol. Environ. Saf. 47, 117–124.

Carvalho FT, Velini ED, Negrisoni E, Rossi CVS, 2005. Eficácia do carfentrazone-ethyl no controle de plantas aquáticas latifoliadas em caixas-d'água. Planta Daninha. 23(2),305–310

Cavalcante D.G.S.M.,Martinez, C. B. R., Sofia, S. H., 2008. Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*, Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen., 655, 41-46.

Cavas, T., Könen, S., 2007. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. Mutagenesis, 22, 263–268.

Contardo-Jara V., Klingelmann E., Wiegand C., 2009. Bioaccumulation of glyphosate and its formulation Roundup Ultra in *Lumbriculus variegatus* and its effects on biotransformation and antioxidant enzymes. Environ Pollut. 157, 57–63.

Costa, M. J., Monteiro, D. A., Oliveira-Neto, A. L., Rantin, F. T.,Kalinin, A.L., 2008. Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original. Ecotoxicol.17,153–163.

Crestani,M.,Menezes, C., Gluszczak, L., dos Miron, S.D., Lazzari, R., Duarte, F.M., Morsch,M.V., Pippi, L.A., Vieira, P.V., 2006. Effects of clomazone hebicide on hematological and some parameters of protein and carbohydrate metabolism of silver catfish *Rhamdia quelen*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 65, 48–55.

Dutta H. M., Arends, D. A., 2003. Effects of endosulfan on brain acetylcholinesterase activity in juvenile bluegill sunfish. *Environ. Res.* 91, 157-162

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres Jr., V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95

Falfushynska, H.I., Stolyar, O.B., 2009 Responses of biochemical markers in carp *Cyprinus carpio* from two field sites in Western Ukraine. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 729-736.

Flohé L., Otting, F., 1984. Superoxide dismutase assays. *Methods Enzimol.*, 105 93-104.

Galli, A.J.B.; Montezuma, M.C. 2005. Alguns Aspectos da Utilização do herbicida Glifosato na Agricultura. Monsanto, ACADCOM Editora.

Giesy, J.P., Dobson, S., Solomon, K.R. 2000 Ecotoxicological risk assessment for roundup herbicide. *Environ. Contam. Toxicol.* 167, 35–120.

Gluszczak, L., Miron, D.S., Crestani, M., Fonseca, M. B., Pedron, F. A., Duarte, M. F., Vieira, V. L. P. 2006 Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 65, 237–241.

Gluszczak, L., Miron, D. S., Moraes, B.S., Simoes, R.R., Schetinger, M. R. C., Morsch, V. M., Loro, V. L. 2007 Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Comp. Biochem. Physiol.* 146C, 519–524.

Hermes-Lima, M. Oxygen in Biology and Biochemistry. 2004 IN: Storey, K.B. (Ed) Functional Metabolism: Regulation and Adaptation. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey. Cap. 12, 319-368.

Hopkins, J., Tudhope, G.R., 1973. Glutathione peroxidase in human red cells in health and disease. J. Haematol. 25, 563-575.

Jiraungkoorskul, W., Upatham, E.S., Kruatrachue, M., Sahaphong, S., Vichasri- Grams, S., Pokethitoyook, P., 2002. Histopathological effects of Roundup, a glyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Sci. Asia. 28, 121–127.

Keen, J.H., Habig, W.H., Jakobi, W. B. 1976 Mechanism for the several activities of the glutathione-S-transferases. J. Biol. Chem. 251, 6183-6188.

Langiano, V.C., Martinez, C.B.R., 2008. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. Comp. Biochem. Physiol. 147C, 222–231

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurements with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265–275.

Machala, M., Petřivalský, M., Nezveda, K., Ulrico, R., Dušek, L., Piačka, V., Svobodová, Z., 1997. Responses of carp hepatopancreatic 7-ethoxyresorufin- O-deethylase and glutathione-dependent enzymes to organic pollutants — a field study. Environ. Toxicol. Chem. 16, 1410–1416.

Maran, E., Fernández, M., Barbieri, P., Font, G., Ruiz, M.J., 2009 Effects of four carbamate compounds on antioxidant parameters. Ecotoxicol. Environ. Saf. 72, 922-930.

Miron, D., Crestani, M., Schetinger, R.M., Morsch, M.V., Baldisserotto, B., Tierno, A.M., Moraes, G., Vieira, P.L.V., 2005. Effects of the herbicides clomazone, quinclorac, and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 61, 398–403.

Miron, D. S., Pretto, A., Crestani, M., Glusczak L., Schetinger, M. R., Loro, V. L., Morsch, V.M. 2008 Biochemical effects of clomazone herbicide on piava (*Leporinus obtusidens*). *Chemosphere* 74,1–5.

Montserrat, J.M., Bianchini, A., Bainy, A.C.D., 2002. Kinetic and toxicological characteristics of acetylcholinesterase from the gills of oysters (*Crassostrea rhizophorae*) and other aquatic species. *Mar. Environ. Res.* 54, 781–785.

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). *Comp. Biochem. Physiol.* 143C, 141–149.

Oropesa A. L., García Cambero J. P., Soler F., 2008. Effect of long-term exposure to simazine on brain and muscle acetylcholinesterase activity of common carp (*Cyprinus carpio*). *Environ. Toxicol.* 23, 285-293.

Pereira Maduenho, L., Martinez, C.B.R., 2008 Acute effects of diflubenzuron on the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 148C, 265-275.

Rodríguez-Fuentes, G., Armstrong, J., Schlenk, D., 2008 Characterization of muscle cholinesterases from two demersal flatfish collected near a municipal wastewater outfall in Southern California. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 69, 466-471.

Saglio, P., Trijasse, S., 1998. Behavioral responses to atrazine and diuron in goldfish. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35, 484–491.

Sancho, E., Cerón, J.J., Ferrando, M.D., 2000. Cholinesterase activity and hematological parameters as biomarkers of sublethal molinate exposure in *Anguilla anguilla*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 46, 81–86.

Satoh, K., 1978. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin. Chim. Acta*, 90, 37-43.

Storey, K. B., 1996 Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 96,1715-1733.

Tsui, M.T.K., Chu, L.M., 2003. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere* 52, 1189–1197.

Üner, N., Oruç, E.O., Sevgiler, Y., Sahin, N., Durmaz, H., Usta, D., 2006. Effects of diazinon on acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation in the brain of *Oreochromis niloticus*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 21, 241–245.

Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57–149.

Wang, N., Besser, J.M., Buckler, D.R., Honegger, J.L., Ingersoll, C.G., Johnson, B.T., Kurtzweil, M.L., MacGregor, J., McKee, M.J., 2005. Influence of sediment on the fate and toxicity of a polyethoxylated tallowamine surfactant system (MON 0818) in aquatic microcosms. *Chemosphere* 59, 545–551.

Winston, G.W., Di Giulio, R.T., 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 19, 137-161

WHO, World Health Organization, 1994. Glyphosate: *Environ. Health Criteria*159. Genève.

4 ARTIGO 2

**Alterações hematológicas e bioquímicas em *Prochilodus lineatus*
após exposição aguda ao herbicida Roundup Transorb®**

Kathya Assmann Modesto e Cláudia B. R. Martinez

Artigo a ser submetido para publicação na revista Comparative Biochemistry and Physiology, Part C

Alterações hematológicas e bioquímicas em *Prochilodus lineatus* após exposição aguda ao herbicida Roundup Transorb®

Kathya Assmann Modesto e Cláudia B.R. Martinez*

Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil. C.P. 6001. CEP 86051-990.

*corresponding author. Tel.: +55-43-33714650; fax: +55-43-33714207; E-mail address: cbueno@uel.br (C. B. R. Martinez).

RESUMO

O Roundup Transorb® (RDT) é um herbicida a base de glifosato com uma mistura de surfactantes. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos hematológicos, neurotóxicos e bioquímicos deste herbicida para o peixe neotropical *Prochilodus lineatus*. Juvenis foram expostos a 1mg.L⁻¹ de RDT (RDT1), 5mg.L⁻¹ de RDT (RDT5) ou somente a água (CTR) por 6, 24 e 96h e sangue, fígado, cérebro e músculo foram retirados para as análises. Após 24 e 96h, observou-se no RDT5 aumento do número de eritrócitos e também de leucócitos após 96h. A atividade da SOD no RDT5 foi reduzida após 6h, assim como a da CAT após 6 e 24h e no RDT1 após 24h. Após 24 e 96h, a atividade da GPx foi maior no RDT5. O conteúdo de GSH foi menor nos RDT1 e RDT5 após 24h, e maior após 96h no RDT5. A atividade da GST foi reduzida após 6 e 24h no RDT5, entretanto houve aumento de T-Bars no RDT1 após 6h. A atividade da AChE foi inibida no cérebro nos RDT1 e RDT5 após 96h. Assim, conclui-se que o RDT interferiu na hematologia, enzimas antioxidantes e também a acetilcolinesterase, sendo estes efeitos mais evidentes na maior concentração testada.

Palavras-chave: Acetilcolinesterase. Antioxidantes. Estresse oxidativo. Glifosato. Peixe neotropical. Roundup transorb®.

1 Introdução

O glifosato, N-fosfometil-glicina, é um herbicida pós-emergente extensamente usado em vários tipos de culturas. Numerosas formulações comerciais que contêm glifosato como ingrediente ativo tem se tornado popular em todo o mundo devido à sua ação efetiva e baixa toxicidade para mamíferos (CORBERA et al., 2005). O Roundup Transorb[®] (RDT), um exemplo de herbicida que utiliza glifosato como princípio ativo, é classificado como perigoso ao meio ambiente (classe III). Este produto foi lançado no mercado americano em 1998 e está indicado para o controle de pragas na cultura de cana-de-açúcar, café e plantas do gênero *Citrus*. O principal diferencial deste produto em relação às outras formulações é a sua rápida translocação, em torno de 60 minutos (EPA, 2005). A chamada tecnologia Transorb[®] permite que o produto chegue mais rápido e em maior quantidade à raiz da planta invasora, apresentando menor risco de perda em condições adversas como as chuvas. O que permite a rapidez da translocação do princípio ativo é o surfactante utilizado nessa formulação.

Os herbicidas comercializados normalmente contem surfactantes, que são as substâncias que auxiliam a penetração do princípio ativo na planta. Existem vários tipos de surfactantes que são utilizados na formulação dos herbicidas e normalmente essas substâncias apresentam grande toxicidade, sendo responsáveis pela toxicidade dos produtos utilizados. A composição química do surfactante utilizado na formulação Roundup Transorb[®] não é conhecida, pois está protegida como um segredo de marca. O que se sabe é que se trata de uma mistura contendo 15% de amino polioxietileno (POEA) com outras substâncias (HOWE et al., 2004).

Alguns estudos já demonstraram que este produto é muito mais tóxico que a formulação original do Roundup[®] (LORENZO et al., 2003; HOWE et al., 2004; SANTOS et al., 2004), entretanto, a literatura a respeito da toxicidade do Roundup Transorb[®] ainda é escassa, principalmente para animais. Recentemente foi lançado no mercado um novo produto da família Roundup, denominado Roundup Ultra[®], que contém a tecnologia Transorb[®] II, ou seja, provavelmente o mesmo surfactante citado acima ou uma mistura semelhante. Isso indica que esses produtos terão seu uso incentivado,

apesar da falta de dados a respeito da toxicidade destes compostos para o meio ambiente e para animais.

Para avaliar a toxicidade e os efeitos de contaminantes nos animais, os peixes teleósteos têm se mostrado bons modelos, pois suas respostas bioquímicas são similares às aquelas encontradas em mamíferos, assim como outros vertebrados (SANCHO et al., 2000). O *Prochilodus lineatus* é uma espécie de peixe neotropical de importância econômica e bastante apropriada para estudos de toxicidade, pois é uma espécie bem estudada quanto à sua biologia, fisiologia e reprodução e é sensível a poluentes ambientais (MARTINEZ; SOUZA, 2002; MARTINEZ et al., 2004; CAMARGO; MARTINEZ, 2006).

A exposição de peixes a vários tipos de agentes químicos, incluindo os que são comumente utilizados na aquicultura, pode induzir mudanças em algumas variáveis hematológicas (HEATH, 1995), que são frequentemente usadas para avaliar a saúde do peixe (MARTINEZ; SOUZA, 2002). O estudo dos parâmetros sanguíneos em peixes tem sido frequentemente utilizado para a detecção de alterações fisiopatológicas em diferentes condições de estresse (NUSSEY et al., 1995; RANZANI-PAIVA et al., 2005). Parâmetros hematológicos como hematócrito, hemoglobina, número de eritrócitos e de glóbulos brancos são indicadores de toxicidade com grande potencial para aplicação em estudos de impacto ambiental e de toxicidade em animais aquáticos (SANCHO et al., 2000; BARCELLOS et al., 2003).

Os biomarcadores bioquímicos também representam outra boa ferramenta para avaliar os efeitos de contaminantes e auxiliar o monitoramento ambiental (AHMAD et al., 2004). Dentre eles, a atividade da acetilcolinesterase (AChE), uma enzima cuja alteração na atividade está relacionada a contaminação por vários compostos (PAYNE et al., 1995; MIRON et al., 2005; FERRARI et al., 2007). Os inseticidas organofosforados e carbamatos são inibidores da AChE (MONSSERAT et al., 2002), mas alguns estudos (GLUSCZAK et al., 2006 e 2007) também já mostraram que formulações contendo glifosato também podem inibir a atividade da AChE em peixes. Normalmente, a determinação da atividade da AChE é feita em tecido cerebral e muscular, pois o sistema neuromuscular do peixe é principalmente colinérgico e sua atividade é essencial para o comportamento e função muscular normal (PAYNE et al.,

1996). A inibição da AChE no cérebro produz alterações no comportamento e no músculo leva à uma hiper-estimulação das fibras musculares, que podem gerar tetania, paralisia e morte (KIRBY et al., 2000). Em peixes, a AChE cerebral tem sido melhor estudada que a muscular (FERRARI et al., 2007).

Muitos poluentes podem induzir a formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) (AHMAD et al., 2000), como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion superóxido (O_2^-), radical hidroxil ($\cdot OH$). Devido à sua alta reatividade, essas espécies podem causar danos a lipídeos, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos (HERMES LIMA, 2004). Para neutralizar as EROS os animais apresentam uma via de defesa antioxidante constituída por enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (Cu-Zn SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (Se-GPx), e antioxidantes não enzimáticos, como o tripeptídeo glutathione (GSH). A Cu-Zn SOD é a primeira enzima da via antioxidante, catalisa a formação de peróxido de hidrogênio a partir do ânion superóxido, enquanto que a CAT catalisa exclusivamente a quebra do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água (MARTÍNEZ-ÁLVAREZ et al., 2005). A Se-GPx é uma enzima que catalisa a quebra de peróxidos, inclusive o peróxido de hidrogênio, e a GSH é um importante antioxidante não enzimático. A GSH também atua como substrato para a atividade da GPx e de outra enzima, a glutathione-S-transferase (GST), que é uma enzima de detoxificação e participa da fase II da detoxificação de compostos xenobióticos (STOREY et al., 1996). A GST catalisa a conjugação de vários compostos com a glutathione reduzida (OLSEN et al., 2001), transformando um xenobiótico em um composto mais facilmente excretado. Alterações na atividade da GST têm sido associadas com a adaptação do organismo a presença de uma variedade de compostos orgânicos no meio ambiente (GALLAGHER et al., 2001).

Quando as defesas do animal não são suficientes para neutralizar as EROS podem ocorrer danos oxidativos, e um dos danos mais graves é peroxidação de lipídeos das membranas (SCANDALIOS, 2005). A peroxidação lipídica induzida por herbicidas já foi descrita para várias espécies de peixes (GLUSCZAK et al., 2006, 2007; SEVGILER et al., 2004). Por isso, tanto a atividade das enzimas antioxidantes, como a ocorrência de danos oxidativos, têm sido propostas como indicadores de estresse oxidativo mediado por poluentes (AHMAD et al., 2000; LI et al., 2003).

Assim, considerando-se a falta de conhecimento a respeito do potencial tóxico do herbicida Roundup Transorb[®] para animais aquáticos e o crescente estímulo ao uso deste herbicida, o objetivo deste trabalho foi verificar os efeitos do herbicida Roundup Transorb[®] em parâmetros hematológicos e bioquímicos de *Prochilodus lineatus*.

2 Materiais e Métodos

2.1 Animais

Exemplares jovens de *Prochilodus lineatus* (n: 108, comprimento total e peso (média \pm desvio padrão) de $10,06 \pm 1,15$ cm e $9,97 \pm 2,5$ g) fornecidos pela Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina, foram aclimatados por uma semana em tanques de 300L, preenchidos com água desclorada e aerada. Durante este período os peixes foram alimentados a cada 48 h com ração comercial, contendo 36% de proteína. A alimentação foi suspensa 48 h antes do início dos testes e os animais não foram alimentados durante os experimentos.

2.2. Testes de Toxicidade

Para a realização dos testes de toxicidade aguda os animais foram colocados em aquários de 100L, preenchidos com água desclorada e continuamente aerada, em uma densidade de seis animais por aquário. Um grupo de peixes foi exposto somente a água (controle), outro exposto a água contendo 1mg.L^{-1} de RDT (RDT 1) e outro exposto a água contendo 5mg.L^{-1} de RDT (RDT 5). Após testes preliminares, nos quais os peixes não resistiram a concentração de 10mg.L^{-1} de RDT, optou-se por usar as concentrações testadas, nas quais os animais sobreviveram ao longo de todo período de exposição. Todos os experimentos foram feitos com réplicas, sendo realizados separadamente por 6, 24 e 96 h. Durante os experimentos, a temperatura, o oxigênio dissolvido, a condutividade e o pH foram monitorados.

Após a exposição os peixes foram retirados dos aquários e imediatamente anestesiados com benzocaína ($0,1\text{g.L}^{-1}$) para a coleta de sangue da veia caudal, com seringa heparinizada. Em seguida, os animais foram sacrificados por secção medular, medidos e pesados, e amostras de fígado, cérebro e músculo branco foram retiradas,

com auxílio de material de dissecação, e mantidas congeladas a 80°C negativos até o momento dos ensaios.

2.3 Parâmetros Hematológicos

Do sangue coletado, uma alíquota foi usada para a determinação do hematócrito, em capilares de microhematócrito, e do conteúdo de hemoglobina, pelo método da cianometahemoglobina, em espectrofotômetro em 540 nm. Uma amostra de sangue fixada em formol-citrato, foi utilizada para a determinação do número de eritrócitos em câmara de Neubauer espelhada. Para a análise da série branca, esfregaços corados com kit comercial panótico rápido LB (Laborclin Ltda, BR) foram analisados para a contagem total e diferencial de leucócitos. Para a contagem total, foram contadas 2000 células em cada lâmina e para a diferencial, 200 leucócitos em cada lâmina.

2.4 Enzimas do fígado

Os fígados foram pesados, homogeneizados (10X volume) em tampão fosfato de potássio 0,1M e então centrifugados, durante 20 minutos, a 15000 g (4°C) e o sobrenadante foi separado para análises dos parâmetros bioquímicos. A atividade da glutationa-S-transferase (GST) foi determinada seguindo-se a complexação da glutationa reduzida (GSH) com o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), em 340 nm, de acordo com a metodologia descrita por Keen et al. (1976), e expressa em nmol CDNB conjugados. min. mg de proteína⁻¹. A atividade da cobre-zinco superóxido dismutase (CuZn-SOD) foi determinada pelo método de Flohé e Otting (1984), que se baseia na medida da inibição da taxa de redução do citocromo c pelo radical superóxido em 550 nm e foi expressa em U SOD. mg de proteína⁻¹. Uma U de Sod corresponde a quantidade de enzima que promove a inibição de 50% da taxa de redução do citocromo c. A atividade da catalase (CAT) foi determinada de acordo com a técnica descrita por Beutler (1975), seguindo-se a velocidade de decomposição da H₂O₂ pela enzima, através do decréscimo de absorbância em 240 nm, e a atividade foi expressa em µmol H₂O₂.min.mg de proteína⁻¹. A atividade da glutationa peroxidase selênio dependente (Se-GPx) foi determinada pelo método de Hopkins e Tudhope (1973), baseado na

oxidação do NADPH em presença de H_2O_2 em 340nm, e expressa em $\mu\text{mol NADPH oxidado. min.mg de proteína}^{-1}$.

2.5 Antioxidante não enzimático

A concentração de glutathiona reduzida (GSH) foi determinada pela reação da glutathiona com o 5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico (DTNB), formando o tiolato (TNB) de cor amarelada, em 412 nm e expressa em $\mu\text{g de GSH. mg de proteína}^{-1}$, através de uma curva padrão de GSH.

2.6 Peroxidação lipídica

Os peróxidos produzidos foram quantificados pelo ensaio TBARS que se baseia na reação do malondialdeído (MDA) com o ácido tiobarbitúrico (TBA), de acordo com a metodologia descrita por Satoh, 1978. As amostras de fígado foram incubadas em ácido tricloroacético (TCA) 20% e centrifugadas a 3500 g por 10 min. Ao sobrenadante foi adicionado H_2SO_4 (0,05M) e TBA (0,67%) e as amostras foram mantidas em banho-maria a 100°C , por 30 min. Após o resfriamento foi adicionado álcool n-butílico e o material foi novamente centrifugado. A absorbância do sobrenadante foi determinada em 530 nm e os resultados foram expressos em $\mu\text{mol MDA. mg de proteína}^{-1}$, usando uma curva padrão de malonaldeído (MDA).

2.7 Enzima Acetilcolinesterase

As amostras de cérebro e músculo foram homogeneizadas (10X o volume) em tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 7,5 e centrifugados a 10.000 g, 4°C por 20 minutos e o sobrenadante foi utilizado para as análises. A atividade da enzima foi determinada com base no método colorimétrico de Ellman et al. (1961) adaptado para leitura em microplaca, de acordo com Alves Costa et al. (2007). A concentração final do substrato iodeto de acetilcolina utilizada foi de 9 mM e do reagente de cor 5,5'-ditiobis(2-ácido nitrobenzóico) (DTNB) foi de 0.5mM, para ambos os tecidos. A absorbância foi determinada em uma leitora de microplacas em 415 nm, a atividade da enzima expressa em $\text{nmol DTNB.min.mg prot}^{-1}$.

A concentração de proteínas de todas as amostras em todos os ensaios foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951), usando albumina bovina como padrão.

2.8 Análise Estatística

Para todos os parâmetros analisados, as diferenças entre os grupos controles e experimentais foram analisadas pela análise de variância paramétrica (ANOVA-critério único) ou não paramétrica (Kruskall-Wallis), dependendo da distribuição dos dados e homogeneidades das variâncias. Nos casos em que houve indicação de diferenças, elas foram localizadas por testes de comparações múltiplas. Foram considerados significativos valores de $P < 0,05$.

3 Resultados

Durante a realização dos testes não houve mortalidade de peixes em nenhum grupo experimental. Durante os experimentos, os parâmetros físico-químicos da água foram monitorados e mantidos constantes (Tabela 1).

Tabela 1 – Parâmetros físicos e químicos da água durante o período de aclimação e durante a realização dos testes de toxicidade nos diferentes tempos experimentais, tanto para os grupos expostos apenas à água (Controle), quanto para os grupos expostos a 1mg.L^{-1} de Roundup Transorb® (RDT 1) e a 5mg.L^{-1} de Roundup Transorb® (RDT 5).

	Temperatura (°C)	pH	OD ($\text{mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$)	Condutividade ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)	Dureza ($\text{mg CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$)
Aclimação	$23,0 \pm 1,8$	$6,9 \pm 1,2$	$6,9 \pm 0,7$	$69,9 \pm 1,6$	44
Controle	$25,7 \pm 0,5$	$7,4 \pm 0,2$	$6,9 \pm 0,8$	$53,7 \pm 10,4$	44
RDT 1	$25,0 \pm 0,4$	$7,4 \pm 0,1$	$7,0 \pm 0,8$	$62,8 \pm 4,4$	44
RDT 5	$25,1 \pm 0,3$	$7,3 \pm 0,1$	$6,8 \pm 0,8$	$61,9 \pm 2,5$	44

Os valores correspondem à média \pm EP. A dureza da água foi determinada apenas uma vez para cada situação experimental.

Os resultados dos parâmetros hematológicos analisados estão apresentados na Tabela 2. Foi observado um aumento significativo do hematócrito e do número de eritrócitos nos peixes do grupo RDT 5, após 24 e 96 horas de exposição. Também houve aumento significativo do número de leucócitos totais e do número de linfócitos e redução do número de neutrófilos no mesmo grupo após 96 horas de exposição.

Tabela 2 – Parâmetros sanguíneos de *Prochilodus lineatus* expostos somente a água (Ctr), a 1mg.L^{-1} de Roundup Transorb® (RDT 1) ou a 5mg.L^{-1} de Roundup Transorb® (RDT 5), por diferentes tempos experimentais (6, 24 e 96h). Hb (hemoglobina), Ht (hematócrito), RBC (eritrócitos), LT (leucócitos totais), Lin (linfócitos), Neut (neutrófilos), Mon (monócitos), Eosi (eosinófilos), Bas (basófilos).

		Hb (g.dL^{-1})	Ht (%)	RBC ($\cdot 10^6 \text{cel.mm}^{-3}$)			
6h	Ctr	$7,45 \pm 0,47$	$32,24 \pm 1,2$	$2,89 \pm 1,40$			
	RDT 1	$8,05 \pm 0,89$	$33,78 \pm 0,99$	$2,88 \pm 1,6$			
	RDT 5	$7,56 \pm 0,74$	$32,54 \pm 0,48$	$2,87 \pm 1,04$			
24h	Ctr	$7,85 \pm 0,53$	$31,33 \pm 0,67$	$2,29 \pm 0,13$			
	RDT 1	$8,58 \pm 0,62$	$34,60 \pm 1,60$	$2,27 \pm 0,10$			
	RDT 5	$6,96 \pm 0,47$	$35,20 \pm 1,02^*$	$2,38 \pm 0,11^*$			
96h	Ctr	$8,04 \pm 0,78$	$33,47 \pm 1,00$	$2,54 \pm 0,85$			
	RDT 1	$8,21 \pm 1,01$	$34,57 \pm 1,96$	$2,53 \pm 1,00$			
	RDT 5	$7,89 \pm 1,04$	$36,95 \pm 0,48^*$	$2,65 \pm 0,79^*$			
		LT ($\cdot 10^3 \text{c.mm}^3$)	Lin (%)	Neut(%)	Mon(%)	Eos(%)	Bas(%)
6h	Ctr	$201,3 \pm 8,7$	$54,9 \pm 0,9$	$38,4 \pm 1,7$	$5,1 \pm 0,9$	$0,8 \pm 0,4$	$0,8 \pm 0,3$
	RDT1	$201,5 \pm 6,4$	$55,1 \pm 0,9$	$38,5 \pm 1,4$	$5,0 \pm 0,8$	$0,9 \pm 0,8$	$0,6 \pm 0,4$
	RDT5	$202,7 \pm 4,8$	$55,2 \pm 0,8$	$37,9 \pm 1,8$	$5,1 \pm 0,5$	$0,9 \pm 0,7$	$0,9 \pm 0,5$
24h	Ctr	$202,9 \pm 5,1$	$54,5 \pm 1,1$	$39,0 \pm 1,1$	$4,9 \pm 1,1$	$0,7 \pm 0,5$	$0,9 \pm 0,6$
	RDT1	$203,4 \pm 4,1$	$54,8 \pm 0,7$	$38,8 \pm 0,7$	$5,0 \pm 0,6$	$0,9 \pm 0,7$	$0,5 \pm 0,4$
	RDT5	$202,8 \pm 6,8$	$55,0 \pm 0,9$	$38,8 \pm 1,0$	$4,8 \pm 1,2$	$0,8 \pm 0,6$	$0,6 \pm 0,3$
96h	Ctr	$201,7 \pm 7,4$	$54,7 \pm 0,8$	$39,2 \pm 0,9$	$4,8 \pm 0,9$	$0,8 \pm 0,4$	$0,5 \pm 0,4$
	RDT1	$201,9 \pm 6,7$	$54,1 \pm 0,4$	$39,8 \pm 0,8$	$4,8 \pm 0,7$	$0,9 \pm 0,6$	$0,4 \pm 0,2$
	RDT5	$220,1 \pm 4,7^*$	$60,1 \pm 0,5^*$	$34,9 \pm 0,4^*$	$4,0 \pm 0,5$	$0,4 \pm 0,3$	$0,6 \pm 0,3$

Os resultados correspondem a média \pm erro padrão, (n: 5-6). * indica diferença significativa em relação ao respectivo controle ($p < 0,05$).

Em relação aos antioxidantes (Fig. 1), verificou-se que a atividade da SOD apresentou redução significativa nos peixes expostos a maior concentração do herbicida por 6 horas, em relação ao respectivo controle. A atividade da CAT mostrou decréscimo significativo no grupo RDT 1 após 24 horas de exposição e no grupo RDT 5 após 6 e 24 horas de exposição, em relação aos respectivos controles. Por outro lado, a atividade da GPx aumentou significativamente em relação aos respectivos controles no grupo RDT 5 após 24 e 96 horas de exposição. Mas a atividade da GST foi inibida no grupo RDT 5 após 6 e 24 horas de exposição, em relação aos respectivos controles. A concentração da GSH diminuiu após 24 horas de exposição a ambas as concentrações do herbicida, em relação aos controles. Entretanto, os peixes do grupo RDT 5, apresentaram aumento significativo da GSH após 96 horas de exposição ao herbicida, quando comparado ao respectivo controle.

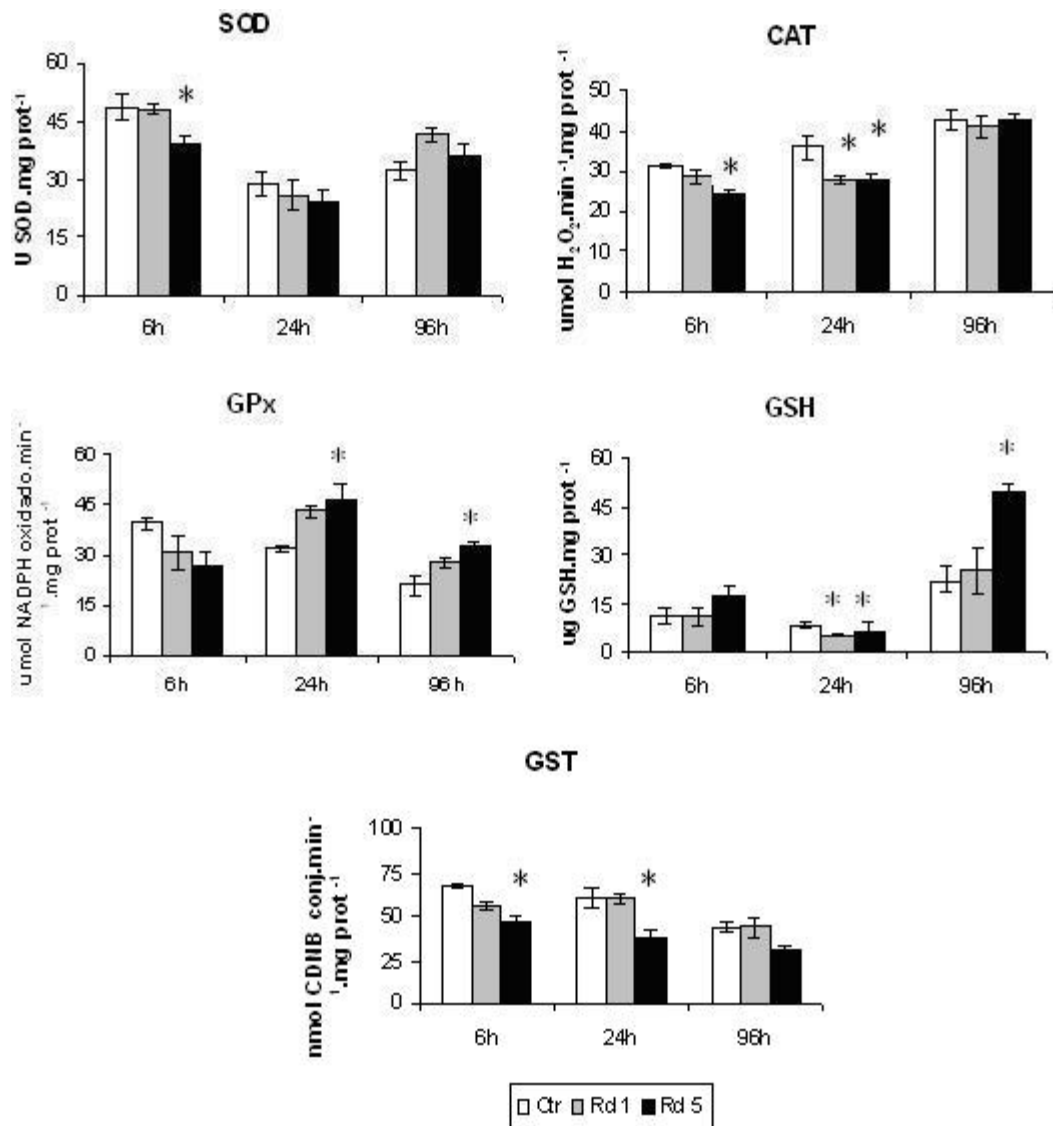


Figura 1 – Atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx, GST e do antioxidante não enzimático GSH no fígado de *Prochilodus lineatus* expostos a 1 mg.L^{-1} de Roundup Transorb® (RDT 1), 5 mg.L^{-1} de Roundup Transorb® (RDT 5) ou somente a água (Ctr), por diferentes tempos experimentais (6, 24 e 96h). As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão (n: 5-6). * indica diferença significativa em relação ao respectivo controle ($P < 0,05$).

Em relação a peroxidação lipídica (Fig. 2), observou-se aumento da concentração de MDA apenas no fígado dos peixes expostos a menor concentração do herbicida durante 6 horas, em relação ao seu respectivo controle.

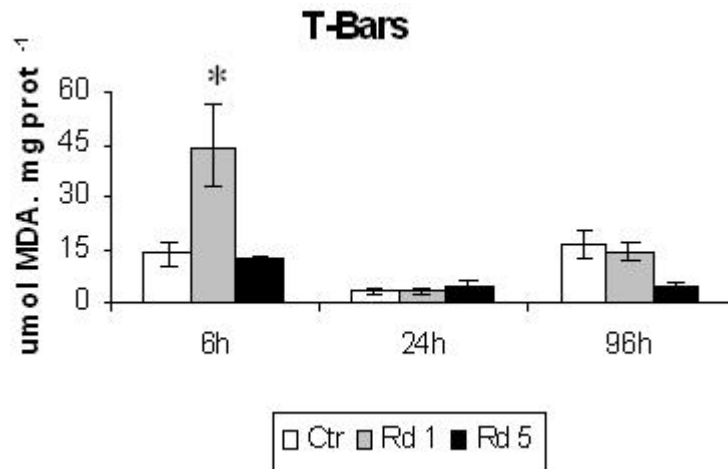


Figura 2 – Níveis de peroxidação lipídica, estimados pela quantidade de malondialdeído (MDA), no fígado de *Prochilodus lineatus* expostos a 1mg.L^{-1} de Roundup Transorb® (RDT1), 5mg.L^{-1} de Roundup Transorb® (RDT5) ou somente a água (Ctr), por diferentes tempos experimentais (6, 24 e 96h). As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão (n:6). * indica diferença significativa em relação respectivo controle ($P<0,05$).

A atividade da acetilcolinesterase (Fig. 3) foi inibida no cérebro de *P. lineatus* após 96 horas de exposição às duas concentrações do herbicida, em relação aos respectivos controles. Já com relação ao músculo, não houve alteração da atividade da enzima em nenhuma das concentrações em nenhum dos tempos de exposição.

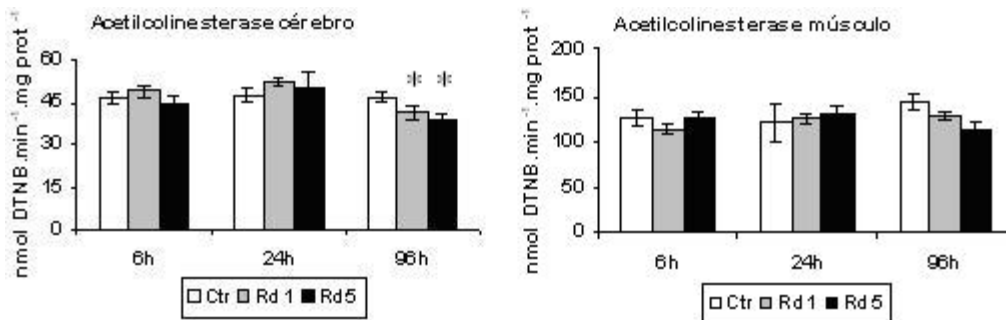


Figura 3 – Atividade acetilcolinesterase no cérebro e no músculo de *Prochilodus lineatus* expostos a 1mg.L^{-1} de Roundup Transorb® (RDT 1), 5mg.L^{-1} de Roundup Transorb® (RDT 5) ou somente a água (Ctr) por diferentes tempos experimentais (6, 24 e 96h). As barras indicam a média e as linhas verticais o erro padrão (n:6). *indica diferença significativa em relação ao respectivo controle ($p<0,05$).

4 Discussão

Este é o primeiro estudo mostrando que o Roundup Transorb[®], um herbicida relativamente novo no mercado e extensamente utilizado na agricultura, pode produzir alterações significativas em parâmetros hematológicos e bioquímicos de peixes. Neste trabalho constatou-se que o herbicida é um inibidor da acetilcolinesterase cerebral, além de promover alterações importantes na hematologia e nas defesas antioxidantes da espécie de peixe neotropical *Prochilodus lineatus*.

As análises hematológicas nos peixes expostos aos testes com o Roundup Transorb[®] indicaram um aumento no número de células sanguíneas, tanto da série vermelha, como da série branca. O aumento do hematócrito e do número de eritrócitos verificado nos peixes expostos a maior concentração do herbicida, durante 24 e 96 horas, pode ser decorrente de uma contração esplênica, desencadeada como possível resposta de estresse, numa tentativa de manter níveis de oxigênio adequados na corrente sanguínea. Este resultado se contrapõe aos resultados verificados por Gluszczak et al. (2006), que observaram diminuição do hematócrito, do número de eritrócitos e da hemoglobina de *Leporinus obtusidens* expostos a diferentes concentrações do Roundup[®] (3, 6, 10 e 20 mg.L⁻¹) durante 96 horas. Essa diferença na resposta pode ser explicada pelo fato de se tratar de diferentes espécies de peixes, e que, podem reagir de forma diferente ao estresse imposto pelo contaminante. Também deve-se ressaltar o fato de que são compostos com formulações diferentes, apesar de usarem o mesmo princípio ativo, o glifosato. Com relação à série branca, o aumento do número total de leucócitos e de linfócitos após 96 horas de exposição ao RDT mostra que o herbicida pode causar processos inflamatórios, já que os linfócitos de peixes participam deste processo (SILVA-SOUZA et al., 2000). Além disso, outros fatores intrínsecos e extrínsecos, também podem causar grande variabilidade nos parâmetros hematológicos de peixes (RANZANI-PAIVA et al., 2004).

Com relação às enzimas antioxidantes, a redução na atividade da SOD após 6 horas de exposição a maior concentração do herbicida pode estar relacionada à produção de oxidantes. Sabe-se que existe uma complexa via de interação entre as enzimas envolvidas no processo de defesa antioxidante do animal, e a atividade de

uma enzima influencia na atividade de outras enzimas. Sabe-se também, que o substrato ou produto de algumas das enzimas antioxidantes também podem influenciar na atividade de outras. O peróxido de hidrogênio em excesso pode reduzir a atividade da SOD, enquanto o ânion superóxido pode ser responsável pela redução na atividade da Cat (BAGNYUKOVA et al., 2006). Assim, pode-se supor que o peróxido de hidrogênio esteja sendo responsável pela redução observada na atividade da SOD. Essa hipótese se confirma pelo fato de que a atividade da CAT também foi reduzida nos peixes, após 6 e 24 horas de exposição ao herbicida, propiciando o acúmulo de peróxido de hidrogênio na célula. Da mesma forma, essa redução na atividade da CAT pode ser devido aos íons superóxidos, que provavelmente não estão sendo neutralizados de forma eficiente pela SOD. O sistema SOD-CAT constitui a primeira linha de defesa contra a toxicidade do oxigênio, devido aos efeitos inibitórios na formação de oxiradicais (PANDEY et al., 2003) e essas enzimas são frequentemente usadas como biomarcadores, indicando a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (MONTEIRO et al., 2006). No presente trabalho, a inibição das duas enzimas é um indício de interferência nas defesas antioxidantes do peixe, causada nas primeiras 24 horas de exposição ao herbicida.

A GSH é um importante componente do processo de detoxificação e também atua na prevenção de estresse oxidativo celular (MONTEIRO et al., 2006), sendo o mais importante antioxidante não enzimático da célula (HERMES LIMA, 2004). No presente trabalho a diminuição da concentração hepática de GSH, nos peixes expostos por 24 horas a ambas as concentrações do herbicida, pode estar relacionada com o aumento da atividade hepática da GPx neste mesmo tempo experimental, pois a GPx é uma enzima que utiliza a glutatona reduzida como substrato. Por outro lado, após 96 horas de exposição a maior concentração do herbicida, a concentração da GSH aumentou significativamente. Neste caso, a síntese de GSH deve ter sido estimulada para proteger os hepatócitos da ação das EROS. O aumento significativo da atividade da GPx no peixes do grupo RDT 5, após 24 e 96 horas de exposição ao herbicida, indica que esta via antioxidante foi estimulada provavelmente devido ao aumento de peróxidos produzidos. Apesar desta enzima atuar principalmente na remoção de peróxidos orgânicos, ela também está envolvida na metabolização do peróxido de

hidrogênio (ZHANG et al., 2004; MARAN et al., 2009). Assim, a ativação da GPx no tempo de 24h pode indicar uma resposta para compensar a inibição da CAT neste período de exposição.

Já com relação à atividade da GST, a redução da atividade desta enzima nos peixes do grupo RDT 5 após 6 e 24 horas poderia estar relacionada com a presença de oxidantes que poderiam levar a inativação da atividade enzimática (BAGNYUKOVA et al., 2006). Outra hipótese seria a quantidade insuficiente de GSH, que também atua como substrato para a GST. De qualquer forma, essa resposta inibitória mostra que a GST provavelmente não atua na metabolização dos compostos presentes no Roundup Transorb[®], ou em sobre seus metabólitos.

As espécies reativas de oxigênio, quando não neutralizadas, podem reagir com lipídeos de membrana (AHMAD et al., 2000), produzindo a peroxidação dos lipídios das membranas, que é considerada uma das principais consequências do estresse oxidativo (HERMES LIMA, 2004). No presente trabalho a ocorrência de peroxidação lipídica foi indicada apenas pelo aumento transitório de MDA nos peixes expostos a menor concentração do herbicida durante 6 horas. Entretanto, é preciso considerar que este aumento de MDA talvez não seja resultado do estresse oxidativo. O malondialdeído (MDA) não é um produto exclusivo da peroxidação lipídica, podendo ser proveniente de outros processos celulares, além de também não ser o único produto deste processo (VAN DER OOST et al., 2003). Portanto, um aumento de MDA pode ser proveniente de outros processos e não necessariamente da peroxidação lipídica.

Em relação a acetilcolinesterase, a inibição na atividade desta enzima no cérebro dos peixes expostos às duas concentrações do herbicida por 96 horas, condiz com outros trabalhos que também relataram a inibição da acetilcolinesterase em diferentes espécies de peixes expostas ao Roundup[®] (GLUSCZAK et al., 2006 e 2007). Essa inibição deve-se muito mais provavelmente ao surfactante utilizado no produto formulado do que ao glifosato (GIESY et al., 2000). A inibição da atividade desta enzima pode gerar alterações no comportamento de natação, fuga e alimentação (BRETAUD et al., 2000), interferindo diretamente com a sobrevivência da espécie.

De maneira geral, com os resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir que a formulação do Roundup Transorb[®] é tóxica para *Prochilodus lineatus*. Os resultados

mostraram uma relação dose dependente. A maior concentração testada (5 mg.L^{-1}) inibiu a atividade de enzimas antioxidantes logo após 6 horas de exposição e inibiu também a principal enzima de detoxificação de xenobióticos, a GST, após 24h de exposição. As duas concentrações testadas tiveram ação anticolinesterásica no cérebro dos peixes, após 96 horas. O desconhecimento da mistura utilizada como surfactante neste composto dificulta o estabelecimento de quais substâncias sejam responsáveis pela toxicidade deste herbicida. De modo geral, a falta de estudos com o produto e o conhecimento do impacto deste em animais e no meio ambiente é um fator preocupante, tendo em vista o crescente incentivo ao uso deste herbicida. Dessa forma, mais estudos necessários para o melhor entendimento das vias de atuação do Roundup Transorb[®] nos animais.

Referências

Ahmad, I., Hamid, T., Fatima, M., Chand, H.S., Jain, S.K., Athar, M., Raisudin, S., 2000. Raisuddin, S. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Biochim. Biophys. Acta* 1523, 37–48.

Ahmad, I., Pacheco, M., Santos, M.A., 2004. Enzymatic and enzymatic antioxidants as an adaptation to phagocytes induced damage in *Anguilla anguilla* L following in situ harbour water exposure. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 57, 290–295.

Alves Costa, J.R.M., Mela, M., Silva de Assis, H.C., Pelletier, E., Randi, M.A.F., Oliveira Ribeiro, C.A., 2007. Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 67, 82-88.

Bagnyukova T. V., Chahrak O. I., Lushchak V. I., 2006. Coordinated response of goldfish antioxidant defenses to environmental stress. *Aquat Toxicol.* 78 ,325–331

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. *Aquacul. Res.* 34, 1565-1469.

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

Brethead, S., Toutant, J.P., Saglio, P., 2000. Effects of carbofuran, diuron and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 47, 117–124.

Camargo, M.M.P., Martinez, C.B.R. 2006 Biochemical and physiological biomarkers in *Prochilodus lineatus* submitted to in situ tests in an urban stream in southern Brazil. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 21, 61–69.

Corbera, M., Hidalgo, M., Salvado, V., Wieczorek, P.P. 2005. Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in natural water using the capillary electrophoresis combined with enrichment step. *Analytica Chimica Acta*, 540, 3-7.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres Jr., V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95

EPA, Environmental Protection Agency, disponível em www.epa.gov

Ferrari, A., Venturino, A., Péchen de D'Angelo, A. M., 2007. Muscular and brain cholinesterase sensitivities to azinphos methyl and carbaryl in the juvenile rainbow trout *Oncorhynchus Mykiss*. *Comp. Biochem. Physiol* 146C, 308–313.

Flohé L., Otting, F., 1984. Superoxide dismutase assays. *Methods Enzimol.*, 105 93–104.

Gallagher, E.P.; Gross, T.S.; Sheehy, K.M.; 2001. Decreased glutathione S-transferase expression and activity and altered sex steroids in lake Apopa brown bullheads (*Ameiurus nebulosus*). *Aquat. Toxicol.* 55, 223-237.

Giesy, J.P., Dobson, S., Solomon, K.R. 2000 Ecotoxicological risk assessment for roundup herbicide. *Environ Contam Toxicol.* 167, 35–120.

Gluszczak, L., Miron, D.S., Crestani, M., Fonseca, M. B., Pedron, F. A., Duarte, M. F., Vieira, V. L. P. 2006 Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Ecotoxicol. Environ Safe* . 65, 237–241.

Gluszczak, L., Miron, D. S., Moraes, B.S., Simoes, R.R., Schetinger, M. R. C., Morsch, V. M., Loro, V. L. 2007 Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Comp Biochem Physiol*, 146C, 519–524.

Heath, A.G. 1995 *Water Pollution and Fish Physiology*. 2ed. Lewis Publishers, Boca Raton.

Hermes-Lima, M .Oxygen in Biology and Biochemistry. 2004 IN: Storey, K.B. (Ed) *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey. Cap. 12, 319-368.

Hopkins, J., Tudhope, G.R., 1973. Glutathione peroxidase in human red cells in health and disease. *J Haematol*. 25, 563-575.

Howe CM, Berrill M, Pauli DB, Helbing CC, Werr K, Veldhoen N ,2004 Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species. *Environ Toxicol Chem* 23,1928–1938

Keen, J.H., Habig, W.H., Jakobi, W. B. 1976 Mechanism for the several activities of the glutathione-S-transferases. *J Biol Chem*. 251, 6183-6188.

Kirby, M.F., Morris, S., Hurst, M., Kirby, S.J., Neall, P., Tylor, T., Fagg, A., 2000. The use of cholinesterase activity in flounder (*Platichthys flesus*) muscle tissue as a biomarker of neurotoxic contamination in UK estuaries. *Mar. Poll. Bull*. 40, 780–791.

Li, W., Yin, D., Zhou, Y., Hu, S., Wang, L., 2003. 3,4-Dichloroaniline-induced oxidative stress in liver of crucian carp (*Carassius auratus*). *Ecotoxicol. Environ. Saf*. 56, 251–255.

Lorenzo, E.; Gómez de Barreda, D. ,Vendrell, E., Carrasco, J.M. 2003 Toxicity of three glyphosate formulations to *Aphanius iberus*, AGRIS

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.

Maran, E., Fernández, M., Barbieri, P., Font, G., Ruiz, M.J., 2009 Effects of four carbamate compounds on antioxidant parameters. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 922-930

Martínez-Álvarez, R.M., Morales, A.E., Sanz, A. 2005 Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors. *Reviews in Fish Biology and Fisheries.* 15, 75–88.

Martinez, C.B.R., Nagae, M.Y., Zaia, C.T.B.V., Zaia, D.A.M. 2004 Morphological and physiological acute effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Braz. J. Biol.* 64,797-807.

Martinez, C.B.R., Souza, M.M.2002 Acute effects of nitrite on ion regulation in two neotropical fish species. *Comp. Biochem. Physiol.* 133A, 151-160.

Miron, D., Crestani, M., Schetinger, R.M., Morsch, M.V., Baldisserotto, B., Tierno, A.M., Moraes, G., Vieira, P.L.V., 2005. Effects of the herbicides clomazone, quinclorac, and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 61, 398–403.

Monserrat, J.M., Bianchini, A., Bainy, A.C.D., 2002. Kinetic and toxicological characteristics of acetylcholinesterase from the gills of oysters (*Crassostrea rhizophorae*) and other aquatic species. *Mar. Environ. Res.* 54, 781–785.

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). *Comp Biochem Physiol*, 143C,141–149.

Nussey, G., Van Vuren, J. H. J., Preez, H. H. 1995. Effect of copper on the haematology and osmoregulation of the Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 111C, 369-380.

Olsen, T., Ellerbeck, L., Fisher T., Callaghan, A., Crane, M., 2001. Variability in acetylcholinesterase and glutathione S-transferase activities in *Chironomus riparius* meigen deployed in situ at uncontaminated field sites. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 1725-1732.

Pandey, S., Parvez, S., Sayeed, I., Haque, R., Bin-Hafeez, B., Raisuddin, S., 2003. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.). *Sci. Total Environ.* 309, 105–115.

Payne, J.F., Mathieu, A., Melvin, W., Fancey, L.L., 1996. Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. *Mar. Pollut. Bull.* 32, 225–231.

Ranzani-Paiva, M.J.T.; Silva-Souza, A.T. 2004. Hematologia de peixes brasileiros. In: Ranzani-Paiva, M.J.T.; Takemoto, R.M.; Lizama, M.A.P. (Ed.) *Sanidade de organismos aquáticos*. São Paulo: Editora Varela, p.89-120.

Ranzani-Paiva, M.J.T., Godinho, H.M. 1983. Sobre células sangüneas e contagem diferencial de leucócitos e eritroblastos em curimatá, *Prochilodus scrofa* Steindacher, 1881 (Osteichthyes, Cypriniformes, Prochilodontidae). Rio de Janeiro, *Rev Bras Biol.* 43, 331-338.

Sancho, E., Cerón, J.J., Ferrando, M.D., 2000. Cholinesterase activity and hematological parameters as biomarkers of sublethal molinate exposure in *Anguilla anguilla*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 46, 81–86.

Santos, J.B., Ferreira, E.A., Kasuya, M.C.M., Silva, A.A., Procópio, S.O.; 2005. Tolerance of *Bradyrhizobium strains* to glyphosate formulations. *Crop Protection* 24, 543–547.

Satoh, K., 1978. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin. Chim. Acta*, 90, 37-43.

Scandalios, J. G., 2005 Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38, 995-1014.

Sevgiler, Y., Oruç, E.O., Üner, N., 2004. Evaluation of etoxazole toxicity in the liver of *Oreochromis niloticus*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 78, 1–8.

Silva-Souza, A. T., Almeida, S. C., Machado, P. M., 2000. Effect of the infestation by *Lernaea cyprinacea* Linnaeus, 1758 (Copepoda, Lernaeidae) on the leucocytes of *Schizodon intermedius* Garavelo & Britski 1990 (Osteichthyes, Anostomidae). *Rev. Bras. Biol.* 60, 217-220.

Storey, K. B., 1996 Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 96, 1715-1733.

Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57–149.

Zhang, J., Shen, H., Wang, X., Wu, J., Xue, Y., 2004. Effects of chronic exposure of 2,4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish *Carassius auratus*. *Chemosphere.* 55, 167–174.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A exposição aguda aos dois herbicidas à base de glifosato, o Roundup® (RD) e o Roundup Transorb® (RDT), promoveu alterações nas defesas antioxidantes de *P. lineatus*. De modo geral, as atividades das enzimas antioxidantes e da enzima de biotransformação, no fígado dos peixes expostos aos dois herbicidas, foram alteradas. A atividade da acetilcolinesterase também foi inibida em ambos os estudos. Estes resultados estão apresentados de forma resumida na Tabela a seguir.

Tabela 1 – Comparação dos resultados obtidos nos estudos realizados com *P. lineatus* expostos a 10 mg.L⁻¹ de Roundup® (RD 10), 1 mg.L⁻¹ de Roundup Transorb® (RDT 1) e 5 mg.L⁻¹ de Roundup Transorb® (RDT 5), durante diferentes períodos experimentais (6, 24 e 96h). Os sinais =, ↓ e ↑ indicam, respectivamente, ausência de diferença, redução ou aumento significativo em relação ao respectivo controle.

	RD 10			RDT 1			RDT 5		
	06h	24h	96h	06h	24h	96h	06h	24h	96h
SOD	=	↓	=	=	=	=	↓	=	=
CAT	=	=	=	=	↓	=	↓	↓	=
GPx	=	↓	=	=	=	=	=	↑	↑
GST	=	↑	↑	=	=	=	↓	↓	=
GSH	=	↑	=	=	↓	=	=	↓	↑
LPO	=	↑	↑	↑	=	=	=	=	=
AChE cérebro	=	=	↓	=	=	↓	=	=	↓
AChE músculo	=	↓	↓	=	=	=	=	=	=

SOD: atividade hepática da superóxido dismutase; CAT: atividade hepática da catalase; GPx: atividade hepática da glutathiona peroxidase; GST: atividade hepática da glutathiona transferase; GSH: conteúdo hepático de glutathiona reduzida; LPO: ocorrência lipoperoxidação no fígado; AChE: atividade da acetilcolinesterase.

Os resultados mostraram que tanto o RD como o RDT inibiram a atividade da SOD. Já com relação a CAT, o RDT inibiu a atividade da enzima, enquanto

que o RD não alterou este parâmetro. Em relação à atividade da GPx e da GST, observaram-se respostas contrárias. Enquanto o RD reduziu a atividade da GPx, o RDT aumentou a mesma. Já para a GST, o RD estimulou a atividade da enzima, enquanto que a mesma foi inibida pelo RDT. O conteúdo de GSH foi menor após a exposição ao RD e no caso do RDT, foi menor em alguns testes e maior em outros. Talvez a principal diferença entre a ação dos dois herbicidas esteja relacionada à lipoperoxidação. Nos experimentos realizados com RD, houve indicação de estresse oxidativo, conforme indicado pelo aumento da peroxidação lipídica, o que não ocorreu com o RDT. A exposição ao RD e ao RDT levaram à inibição da atividade da AChE no cérebro. Entretanto, apenas o RD promoveu inibição da AChE muscular. Assim, esses resultados mostram que tanto o RD quanto o RDT interferem nas defesas antioxidantes de *P. lineatus*. No entanto, as vias pelas quais estes herbicidas atuam devem se diferenciar, visto que as alterações observadas não foram correspondentes.

O RD vem sendo substituído pelo RDT, já que esse produto age de maneira mais rápida, quando comparado à formulação mais antiga, o RD. Justamente o que causa o benefício para o usuário, ou seja, a rapidez da ação do herbicida é o principal fator preocupante em relação ao uso do produto, devido ao desconhecimento da composição química do surfactante utilizado. Com base neste estudo, comprova-se que o RDT é mais tóxico para *P. lineatus* do que o RD, já que as concentrações utilizadas de RDT (5mg.L^{-1} e 1mg.L^{-1}) correspondem à metade ou à décima parte da concentração de RD (10mg.L^{-1}) utilizada, pois em testes preliminares os peixes não resistiram a concentração de 10mg.L^{-1} de RDT. Cabe ressaltar que mesmo na menor concentração utilizada de RDT (1mg.L^{-1}) os peixes apresentaram alterações nas suas defesas antioxidantes.

Como a toxicidade do RD é atribuída principalmente ao surfactante utilizado, o POEA, acredita-se que o mesmo aconteça com o RDT, sendo portanto a mistura de surfactantes utilizada na formulação do RDT mais tóxica do que o POEA. Existem poucos trabalhos a respeito da toxicidade do RDT e recentemente, foi lançado um novo produto da mesma linha e que utiliza uma mistura semelhante, chamada de Transorb 2. O incentivo ao uso destes produtos é uma questão preocupante, tendo em vista a falta de dados sobre seus efeitos.

REFERÊNCIAS

ABEL, P.D. Watter Pollution. Ellis Horwood Limited, Chichester. 1989.

AENDA-Associação das Empresas Nacionais de Defensivos Agrícolas. Disponível em: <www.aenda.org.br>.

AHMAD, I., HAMID, T., FATIMA, M., CHAND, H.S., JAIN, S.K., ATHAR, M., RAISUDIN, S., 2000. Raisuddin, S. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. Biochim. Biophys. Acta 1523, 37–48.

AHMAD, I., MARIA, V.L., OLIVEIRA, PACHECO, M.M., SANTOS, M.A. 2006. Oxidative stress and genotoxic effects in gill and kidney of *Anguilla anguilla* L. exposed to chromium with or without pre-exposure to β -naphthoflavone. Mutation Research, 608, 16-28.

AHMAD, I., PACHECO, M., SANTOS, M.A., 2004. Enzymatic and enzymatic antioxidants as an adaptation to phagocytes induced damage in *Anguilla anguilla* L following in situ harbour water exposure. Ecotoxicol. Environ. Safe. 57, 290–295.

ALVES COSTA, J.R.M., MELA, M., SILVA DE ASSIS, H.C., PELLETIER, E., RANDI, M.A.F., OLIVEIRA RIBEIRO, C.A., 2007. Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury. Ecotoxicol. Environ. Safe. 67, 82-88.

AMARANTE JR., O.P., SANTOS, T.C.R., BRITO, N.M., RIBEIRO, M.L., 2002. Glifosato: Propriedades, toxicidade, uso e legislação. Quím. Nova. 25, 589–593.

ARMAS, E.D., 2006. Biogeodinâmica de herbicidas utilizados em cana-de-açúcar (*Saccharum ssp.*) na sub-bacia do rio Corumbataí. Tese (Doutorado em Ecologia de Agroecossistemas) – Universidade de São Paulo, 187 pp.

BAGNYUKOVA T. V., CHAHRAK O. I., LUSHCHAK V. I., 2006. Coordinated response of goldfish antioxidant defenses to environmental stress. Aquat Toxicol. 78 ,325–331.

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. *Aquac. Res.* 34, 1565-1469.

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

BRAUSCH, M.J., SMITH, N.P., 2007. Toxicity of three polyethoxylated tallowamine surfactant formulations to laboratory and field collected fairy shrimp, *Thamnocephalus platyurus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 52, 217–221.

BRETAUD, S., TOUTANT, J.P., SAGLIO, P., 2000. Effects of carbofuran, diuron and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 47, 117–124.

CAMARGO, M.M.P., MARTINEZ, C.B.R. 2006 Biochemical and physiological biomarkers in *Prochilodus lineatus* submitted to in situ tests in an urban stream in southern Brazil. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 21, 61–69.

CARVALHO, F. T, VELINI, E. D, NEGRISOLI, E, ROSSI, C. V. S, 2005. Eficácia do carfentrazone-ethyl no controle de plantas aquáticas latifoliadas em caixas-d'água. *Planta Daninha.* 23(2),305–310

CAVALCANTE, D.G.S.M., MARTINEZ, C. B. R., SOFIA, S. H., 2008. Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*, *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, 655, 41-46.

CAVAS, T., KÖNEN, S., 2007. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagenesis*, 22, 263–268.

CORBERA, M., HIDALGO, M., SALVADO, V., WIECZOREK, P.P. 2005. Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in natural water using the capillary electrophoresis combined with enrichment step. *Analytica Chimica Acta*, 540, 3-7.

CONTARDO-JARA, V., KLINGELMANN, E., WIEGAND, C., 2009. Bioaccumulation of glyphosate and its formulation Roundup Ultra in *Lumbriculus variegatus* and its effects on biotransformation and antioxidant enzymes. *Environ Pollut.* 157, 57–63.

COSTA, M. J., MONTEIRO, D. A., OLIVEIRA-NETO, A. L., RANTIN, F. T., KALININ, A.L., 2008. Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original. *Ecotoxicol.* 17, 153–163.

CRESTANI, M., MENEZES, C., GLUSCZAK, L., DOS MIRON, S.D., LAZZARI, R., DUARTE, F.M., MORSCH, M.V., PIPPI, L.A., VIEIRA, P.V., 2006. Effects of clomazone herbicide on hematological and some parameters of protein and carbohydrate metabolism of silver catfish *Rhamdia quelen*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 65, 48–55.

DUTTA H. M., ARENDS, D. A., 2003. Effects of endosulfan on brain acetylcholinesterase activity in juvenile bluegill sunfish. *Environ. Res.* 91, 157-162

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

EPA, Environmental Protection Agency. Disponível em: <www.epa.gov>.

FALFUSHYNSKA, H.I., STOLYAR, O.B., 2009 Responses of biochemical markers in carp *Cyprinus carpio* from two field sites in Western Ukraine. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 729-736.

FERRARI, A., VENTURINO, A., PÉCHEN DE D'ANGELO, A. M.,; 2007. Muscular and brain cholinesterase sensitivities to azinphos methyl and carbaryl in the juvenile rainbow trout *Oncorhynchus Mykiss*. *Comp. Biochem. Physiol* 146C, 308–313.

FLOHÉ, L., OTTING, F., 1984. Superoxide dismutase assays. *Methods Enzimol.*, 105 93-104.

GALLAGHER, E.P.; GROSS, T.S.; SHEEHY, K.M.; 2001. Decreased glutathione S-transferase expression and activity and altered sex steroids in lake Apopa brown bullheads (*Ameiurus nebulosus*). *Aquat. Toxicol.* 55, 223-237.

GALLI, A.J.B.; MONTEZUMA, M.C. 2005. Alguns Aspectos da Utilização do herbicida Glifosato na Agricultura. Monsanto, ACADCOM Editora.

GHASSEMI, M., L. FARGO, P. PAINTER, S. QUINLIVAN, R. SCOFIELD, A. Takata. 1981. Environmental Fates and Impacts of Major Forest Use Pesticides." P. A-101-148. U.S. EPA. Office of Pesticides and Toxic Substances. Washington D.C.

GIESY, J.P., DOBSON, S., SOLOMON, K.R. 2000 Ecotoxicological risk assessment for roundup herbicide. Environ Contam Toxicol. 167, 35–120.

GLUSCZAK, L., MIRON, D.S., CRESTANI, M., FONSECA, M. B., PEDRON, F. A., DUARTE, M. F., VIEIRA, V. L. P. 2006 Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). Ecotoxicol. Environ Safe. 65, 237–241.

GLUSCZAK, L., MIRON, D. S., MORAES, B.S., SIMOES, R.R., SCHETINGER, M. R. C., MORSCH, V. M., LORO, V. L. 2007 Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). Comp Biochem Physiol, 146C, 519–524.

HEATH, A.G. 1995 Water Pollution and Fish Physiology. 2ed. Lewis Publishers, Boca Raton.

HEAP, I. M. 1997 The occurrence of herbicide resistant weeds world wide. Pestic. Scien., 51: 235-243.

HERMES-LIMA, M. Oxygen in Biology and Biochemistry. 2004 IN: Storey, K.B. (Ed) Functional Metabolism: Regulation and Adaptation. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey. Cap. 12, 319-368.

HOPKINS, J., TUDHOPE, G.R., 1973. Glutathione peroxidase in human red cells in health and disease. J Haematol. 25, 563-575.

HOWE, C. M, BERRILL, M, PAULI, D.B, HELBING, C.C, WERR, K., VELDHOEN, N. 2004 Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species. Environ Toxicol Chem 23, 1928–1938

INQUE, M.H.; OLIVEIRA JR.; REGITANO, J.B.; TORMENA, C.A.; TORNISIELO, V.L.; CONSTANTIN, J. 2003. Critérios para avaliação do potencial de lixiviação dos herbicidas comercializados no estado do Paraná. Plan. Dan. 21, 313-323.

JIRAUNGKOORSKUL, W., UPATHAM, E.S., KRUAATCHUE, M., SAHAPHONG, S., VICHASRI-GRAMS, S., POKETHITIYOOK, P., 2002. Histopathological effects of Roundup, a glyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Sci. Asia. 28, 121–127.

KEEN, J.H., HABIG, W.H., JAKOBI, W. B. 1976 Mechanism for the several activities of the glutathione-S-transferases. J Biol Chem. 251, 6183-6188.

KIRBY, M.F., MORRIS, S., HURST, M., KIRBY, S.J., NEALL, P., TYLOR, T., FAGG, A., 2000. The use of cholinesterase activity in flounder (*Platichthys flesus*) muscle tissue as a biomarker of neurotoxic contamination in UK estuaries. Mar. Poll. Bull. 40, 780–791.

LACHER JR, T.E., GOLDSTEIN, M.I. 1997. Tropical ecotoxicology: status and needs. Environ. Toxicol. Chem., Pensacola.

LANGIANO, V.C., MARTINEZ, C.B.R., 2008. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. Comp. Biochem. Physiol. 147C, 222–231.

LI, W., YIN, D., ZHOU, Y., HU, S., WANG, L., 2003. 3,4-Dichloroaniline-induced oxidative stress in liver of crucian carp (*Carassius auratus*). Ecotoxicol. Environ. Saf. 56, 251–255.

LORENZO, E.; GÓMEZ DE BARREDA, D., VENDRELL, E., CARRASCO, J.M. 2003 Toxicity of three glyphosate formulations to *Aphanius iberus*, AGRIS.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J., 1951. Protein measurements with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265–275.

MACHALA, M., PETŘIVALSKÝ, M., NEZVEDA, K., ULRICO, R., DUŠEK, L., PIAČKA, V., SVOBODOVÁ, Z., 1997. Responses of carp hepatopancreatic 7-ethoxyresorufin-O-deethylase and glutathione-dependent enzymes to organic pollutants — a field study. Environ. Toxicol. Chem. 16, 1410–1416.

- MACK, A., ROBITZKI, A., 2000. The key role of butyrylcholinesterase during neurogenesis and neural disorders: an antisense-50 butyrylcholinesterase- DNA study. *Prog. Neurobiol.* 60, 607–628.
- MARAN, E., FERNÁNDEZ, M., BARBIERI, P., FONT, G., RUIZ, M.J., 2009 Effects of four carbamate compounds on antioxidant parameters. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 922-930.
- MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, R.M., MORALES, A.E., SANZ, A. 2005 Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors. *Reviews in Fish Biology and Fisheries.* 15, 75–88.
- MARTINEZ, C.B.R., NAGAE, M.Y., ZAIA, C.T.B.V., ZAIA, D.A.M. 2004. Morphological and physiological acute effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Braz. J. Biol.* 64,797-807.
- MARTINEZ, C.B.R., SOUZA, M.M.2002. Acute effects of nitrite on ion regulation in two neotropical fish species. *Comp. Biochem. Physiol.* 133A, 151-160.
- MARTINEZ, C. B. R. 2006. Parâmetros bioquímicos de peixes para avaliação da qualidade da água. In: Ângela Teresa Silva-Souza. (Org.). *Sanidade de Organismos Aquáticos no Brasil*. Maringá: ABRAPOA, 2006, p. 43-62.
- MASON, C. F. 1996. *Biology of Freshwater Pollution*. 3ed. Longmann, Essex.
- MIRON, D., CRESTANI, M., SCHETINGER, R.M., MORSCH, M.V., BALDISSEROTTO, B., TIerno, A.M., MORAES, G., VIEIRA, P.L.V., 2005. Effects of the herbicides clomazone, quinclorac, and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 61, 398–403.
- MIRON, D. S., PRETTO, A., CRESTANI, M., GLUSCZAK, L., SCHETINGER, M. R., LORO, V. L., MORSCH, V.M. 2008 Biochemical effects of clomazone herbicide on piava (*Leporinus obtusidens*). *Chemosphere* 74, 1–5
- MONSERRAT, J.M., BIANCHINI, A., BAINY, A.C.D., 2002. Kinetic and toxicological characteristics of acetylcholinesterase from the gills of oysters (*Crassostrea rhizophorae*) and other aquatic species. *Mar. Environ. Res.* 54, 781–785.

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). *Comp Biochem Physiol*, 143C, 141–149.

NUNES-TAVARES, N., MATTA, A.N., BATISTA E SILVA, C.M. ARAÚJO, G.M.N.; LOURO, S.R.W.; HASSON-VOLOCH, A. 2002. Inhibition of acetylcholinesterase from *Electrophorus electricus*(L.) by tricyclic antidepressants. *Intern. J. Biochem. & Cell Biol.* 34, 1071-1079.

NUSSEY, G., VAN VUREN, J. H. J., PREEZ, H. H. 1995. Effect of copper on the haematology and osmoregulation of the Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 111C, 369-380.

OLSEN, T., ELLERBECK, L., FISHER, T., CALLAGHAN, A., CRANE, M., 2001. Variability in acetylcholinesterase and glutathione S-transferase activities in *Chironomus riparius* meigen deployed in situ at uncontaminated field sites. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 1725-1732.

OROPESA, A. L., GARCÍA CAMBERO, J. P., SOLER, F., 2008. Effect of long-term exposure to simazine on brain and muscle acetylcholinesterase activity of common carp (*Cyprinus carpio*). *Environ. Toxicol.* 23, 285-293.

ORUC, O. E., SEVGILER, Y., UNER, N. 2004. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. *Comp. Biochem. Physiol.* 137C, 43–51.

PANDEY, S., PARVEZ, S., SAYEED, I., HAQUE, R., BIN-HAFEEZ, B., RAISUDDIN, S., 2003. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.). *Sci. Total Environ.* 309, 105–115.

PAYNE, J.F., MATHIEU, A., MELVIN, W., FANCEY, L.L., 1996. Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. *Mar. Pollut. Bull.* 32, 225–231.

PEREIRA MADUENHO, L., MARTINEZ, C.B.R., 2008 Acute effects of diflubenzuron on the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 148C, 265-275.

- RAND., G.M.; WELLS, P.G.; MCCARTY, L.S. 1995. Introduction to aquatic toxicology. In: Rand., G.M. Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate and Risk Assessment. 2ed. Ed. Taylor & Francis.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T.; SILVA-SOUZA, A.T. 2004. Hematologia de peixes brasileiros. In: Ranzani-Paiva, M.J.T.; Takemoto, R.M.; Lizama, M.A.P. (Ed.) Sanidade de organismos aquáticos. São Paulo: Editora Varela, p.89-120.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T., GODINHO, H.M. 1983. Sobre células sangüíneas e contagem diferencial de leucócitos e eritroblastos em curimatá, *Prochilodus scrofa* Steindacher, 1881 (Osteichthyes, Cypriniformes, Prochilodontidae). Rio de Janeiro, Rev Bras Biol . 43, 331-338.
- RODRIGUES, B.N.; ALMEIDA, F.S. 2005. Guia de Herbicidas, 5ed. Londrina: IAPAR, 648p.
- RODRÍGUEZ-FUENTES, G., ARMSTRONG, J., SCHLENK, D., 2008 Characterization of muscle cholinesterases from two demersal flatfish collected near a municipal wastewater outfall in Southern California. Ecotoxicol. Environ. Saf. 69, 466-471.
- SAGLIO, P., TRIJASSE, S., 1998. Behavioral responses to atrazine and diuron in goldfish. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 35, 484-491.
- SANCHO, E., CERÓN, J.J., FERRANDO, M.D., 2000. Cholinesterase activity and hematological parameters as biomarkers of sublethal molinate exposure in *Anguilla anguilla*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 46, 81-86.
- SANTOS, J.B., FERREIRA, E.A., KASUYA, M.C.M., SILVA, A.A., Procópio, S.O.; 2005. Tolerance of *Bradyrhizobium strains* to glyphosate formulations . Crop Protection 24, 543-547.
- SATOH, K., 1978. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. Clin. Chim. Acta, 90, 37-43.
- SCANDALIOS, J. G., 2005 Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. Braz. J. Med. Biol. Res. 38, 995-1014.

SEVGILER, Y., ORUÇ, E.O., ÜNER, N., 2004. Evaluation of etoxazole toxicity in the liver of *Oreochromis niloticus*. Pestic. Biochem. Physiol. 78, 1–8.

SILVA-SOUZA, A. T., ALMEIDA, S. C., MACHADO, P. M., 2000. Effect of the infestation by *Lernaea cyprinacea* Linnaeus, 1758 (Copepoda, Lernaeidae) on the leucocytes of *Schizodon intermedius* Garavelo & Britski 1990 (Osteichthyes, Anostomidae). Rev. Bras. Biol. 60, 217-220.

STOREY, K. B., 1996 Oxidative stress: animal adaptations in nature. Braz. J. Med. Biol. Res. 96,1715-1733.

TSUI, M.T.K., CHU, L.M., 2003. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. Chemosphere 52, 1189–1197.

ÜNER, N., ORUÇ, E.O., SEVGILER, Y., SAHIN, N., DURMAZ, H., USTA, D., 2006. Effects of diazinon on acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation in the brain of *Oreochromis niloticus*. Environ. Toxicol. Pharmacol. 21, 241–245.

VAN DER OOST, R., BEYER, J., VERMEULEN, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environ. Toxicol. Pharmacol. 13, 57–149.

VAN GESTEL, C.A.M., VAN BRUMMELEN, T.C. 1996. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. Ecotoxicol., 5,217-225.

WANG, N., BESSER, J.M., BUCKLER, D.R., HONEGGER, J.L., INGERSOLL, C.G., JOHNSON, B.T., KURTZWEIL, M.L., MACGREGOR, J., MCKEE, M.J., 2005. Influence of sediment on the fate and toxicity of a polyethoxylated tallowamine surfactant system (MON 0818) in aquatic microcosms. Chemosphere 59, 545–551.

WINSTON, G.W., DI GIULIO, R.T., 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. Aquat. Toxicol. 19, 137-161

WRIGHT, R. T.; Nebel, B. J. 1998. Environmental Science: the way the world works. 6 ed, Prentice Hall.

WHO, World Health Organization, 1994. Glyphosate: Environ. Health Criteria159. Genève.

ZHANG, J., SHEN, H., WANG, X., WU, J., XUE, Y., 2004. Effects of chronic exposure of 2,4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish *Carassius auratus*. Chemosphere. 55, 167–174.