



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CLAUDIA DANIELE CARVALHO NAVARRO

**EFEITOS DO SURFACTANTE POLIOXIETILENO AMINA
(POEA) EM PARÂMETROS GENÉTICOS, BIOQUÍMICOS E
FISIOLÓGICOS DO TELEÓSTEO *PROCHILODUS LINEATUS***

CLAUDIA DANIELE CARVALHO NAVARRO

**EFEITOS DO SURFACTANTE POLIOXIETILENO AMINA
(POEA) EM PARÂMETROS GENÉTICOS, BIOQUÍMICOS E
FISIOLÓGICOS DO TELEÓSTEO *PROCHILODUS LINEATUS***

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia na Instituição Associada Universidade Estadual de Londrina como um dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Bueno dos Reis Martinez.

Londrina
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

N322e Navarro, Claudia Daniele Carvalho.
Efeitos do surfactante polioxietileno amina (POEA) em parâmetros genéticos,
bioquímicos e fisiológicos do teleósteo *Prochilodus lineatus*/ Claudia Daniele
Carvalho Navarro. – Londrina, 2013.
81f.: il.

Orientador: Cláudia Bueno dos Reis Martinez.
Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de
Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa Multicêntrico de Pós-Graduação
em Ciências Fisiológicas, 2013.
Inclui bibliografia

1. Peixe – Efeito dos herbicidas – Teses. 2. Peixe – Stress (Fisiologia) – Teses. 3.
Estresse oxidativo – Teses. 4. Regulação osmótica – Teses. 5. *Prochilodus lineatus* –
Teses. I. Martinez, Cláudia Bueno dos Reis. II. Universidade Estadual de Londrina.
Centro de Ciências Biológicas. Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em
Ciências Fisiológicas. III. Título.

CDU 597.554.1

CLAUDIA DANIELE CARVALHO NAVARRO

**EFEITOS DO SURFACTANTE POLIOXIETILENO AMINA (POEA) EM
PARÂMETROS GENÉTICOS, BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS DO
TELEÓSTEO *PROCHILODUS LINEATUS***

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia na Instituição Associada Universidade Estadual de Londrina como um dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Bueno dos Reis
Martinez
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Renata Guimarães Moreira
Instituto de Biociências da Universidade de São
Paulo – IBUSP

Profa. Dra. Cássia Thaís Bussamra Vieira Zaia
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 25 de fevereiro de 2013.

Dedico este meu trabalho à minha amada avó Maria, hoje não mais presente entre nós, mas deixou a semente de um amor simples e incondicional em nossos corações. A saudade é grande, mas o amor e a certeza que um dia a terei ao meu lado novamente são maiores.

E ainda que eu tivesse o dom da profecia e
conhecesse todos os mistérios e toda a ciência
e tivesse toda a fé e não tivesse amor, nada seria...

(I Coríntios 13:2)

AGRADECIMENTOS

À Professora **Claudia**, obrigada por abrir as portas do seu laboratório para mim, por confiar seu trabalho em minhas mãos. Obrigada pelos ensinamentos, compreensão, atenção, carinho e paciência. Neste tempo em que pude conviver com você pude enxergar um exemplo de profissional a ser seguido, de extrema competência e acima de tudo com um grande coração. Obrigada pelo apoio como excelente orientadora e por ser tão querida nos meus momentos mais frágeis.

Ao **Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas** pela oportunidade e apoio para o desenvolvimento deste trabalho.

À **Daniela Grosso Borin**, secretária do PMPGCF na UEL, obrigada por sempre me receber com muita atenção e gentileza.

Aos órgãos financiadores **CAPES** e **CNPq** pela concessão de bolsa e apoio financeiro.

À **Estação de piscicultura da UEL** pelo fornecimento dos animais.

À Banca Examinadora, **Profa. Dra. Renata Guimarães Moreira** e **Profa. Dra. Cássia Thaís B V Zaia** por ter aceitado o convite e por colaborar com este trabalho.

Aos amigos do **LEFA**: Cássia, Déia, Lu, Dalit, Ju, Lindi. Alexandre, Kelly, Débora, Fer, Carlos, Bruna, Angélica, Carol e Natara e também os que já não estão mais no lab: Naty, Cylene e Fran. Sem vocês seria impossível a realização deste trabalho. E em especial à **Millena**, por toda ajuda durante os experimentos e análises hematológicas.

À **Dalit, Lu** e **Lindi**, obrigada pela amizade e todo carinho. Obrigada por me ajudarem tanto no lab com as técnicas, cálculos e escrita. Obrigada por serem pessoas que sempre mostram tanta boa vontade em ajudar e mais que tudo isso obrigada por serem pessoas tão maravilhosas que vou guardar para sempre em meu coração.

À **Dedéia** e **Cassildis**, obrigada por fazerem das viagens para as disciplinas sempre mais divertidas. Adoro vocês meninas! Vou guardar sempre em meu coração cada momento perto de vocês. Desde nossos estudos no quarto do hotel até o maravilhoso founde em Gramado- RS. Só tenho a agradecer as pessoas maravilhosas que vocês são.

À minha **mãe** e meu **pai**, que no decorrer da minha vida, proporcionaram-me, além de extenso carinho e amor, os conhecimentos da integridade, da perseverança e de procurar sempre em Deus à força maior para o meu desenvolvimento como ser humano. Por essa razão, gostaria de dedicar e reconhecer a vocês, minha imensa gratidão e sempre amor. Obrigada por acreditarem em mim!!! Obrigada por serem sempre meu porto seguro, pelos gestos de carinho, por me darem força em todos os momentos da minha vida, por lutarem comigo. Amo vocês!

Ao meu **Edu**, que sempre está ao meu lado, mesmo nos momentos de tristeza, aflição e desespero. Obrigada por abdicar dos seus sonhos em favor dos meus. Obrigada por acreditar no meu julgamento, por confiar nas minhas decisões mesmo quando elas não são favoráveis aos seus desejos. Obrigada por fazer dos meus sonhos sua realização. Obrigada por sempre ter uma palavra doce e um afago para todos meus momentos. Pela paciência em ler cada parágrafo e me ajudar com meu português. Obrigada por se tornar quem eu preciso no momento em que preciso. Te amo meu amor.

Às minhas **irmãs**, que junto aos meus pais sempre estão me apoiando, me dando forças nos momentos de dificuldades e festejando comigo minhas conquistas! Obrigada pela paciência em meus estudos. Amo vocês, obrigada por fazerem parte da minha vida.

À minha **vó Nena**, obrigada vó por entender minha ausência. Obrigada pelas orações e todo amor incondicional. Obrigada por sempre torcer por mim. Te amo muito.

À minha **família**, em especial ao tio **Silvio**, tia **Káthia**, tio **Sirval** e tia **Sandra**, vocês sempre em palavras e gestos me apoiaram, me incentivaram a lutar por meus ideais. Obrigada! Obrigada por sempre me receberem com um abraço apertado e sorriso no rosto! Amo cada um de vocês!

Ao **cunha**, obrigada pela ajuda nos textos em inglês! Obrigada por escolher nossa família... É muito bom ter você em nossas vidas.

À **Rose**, por sempre me compreender, sempre se fazer presente nos momentos mais complicados da minha vida e estar sempre disposta a ajudar com o maior carinho. Obrigada por existir em nossa família.

À minha eterna amiga **Rê**, que é minha grande amiga, que aguentou meus momentos de estresse, meus desabafos, meus choros, e que também sempre participou de todos os momentos felizes da minha vida. Você é um presente que Deus me deu.

À **Deus**; “O Senhor é o meu rochedo, e o meu lugar forte, e o meu libertador; o meu Deus, a minha fortaleza, em quem confio; o meu escudo, a força da minha salvação, e o meu alto refúgio” (Salmos 18:2).

NAVARRO, C.D.C. **Efeitos do surfactante polioxietileno amina (POEA) em parâmetros genéticos, bioquímicos e fisiológicos do teleósteo *Prochilodus lineatus***. 2013. 81f. Dissertação (Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas - Mestrado) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

RESUMO

O surfactante não iônico polioxietileno amina (POEA) é acrescentado em várias formulações de herbicidas à base de glifosato, que são amplamente utilizados em diversos tipos de cultura e podem contaminar os ecossistemas aquáticos. Assim este trabalho foi desenvolvido em duas partes para avaliar os efeitos do POEA (i) em parâmetros bioquímicos, genéticos e fisiológicos e (ii) na resposta de estresse do peixe dulcícola neotropical *Prochilodus lineatus*. Para realizar a primeira parte do trabalho, peixes jovens foram expostos a 0,15 mg.L⁻¹ (POEA 1), 0,75 mg.L⁻¹ (POEA 2) e 1,5 mg.L⁻¹ (POEA 3) de POEA ou somente a água (CTR) e após 24 h de exposição foram retiradas amostras de sangue, fígado e brânquias. Em relação aos grupos CTR, os peixes expostos ao POEA 2 e POEA 3 apresentaram aumento na atividade hepática da enzima de biotransformação de fase I 7 etoxiresorufina-*O*-desetilase (EROD) e no conteúdo hepático do antioxidante não enzimático glutaciona reduzida (GSH), enquanto que a atividade hepática da enzima de biotransformação de fase II glutaciona-S-transferase (GST) se apresentou diminuída. Por outro lado, os peixes do grupo POEA 1 apresentaram, no fígado, aumento na atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) e na ocorrência de peroxidação lipídica. Nos peixes expostos ao POEA 3 também foi observado um aumento na atividade hepática da enzima antioxidante glutaciona peroxidase (GPx) e uma diminuição no cortisol plasmático. A exposição ao POEA, em todas as concentrações avaliadas, provocou o aumento nas concentrações plasmáticas do lactato e a diminuição na atividade hepática da enzima antioxidante catalase (CAT) e também no número de eritrócitos por volume de sangue e no conteúdo de hemoglobina. O teste do cometa, utilizado para a análise de danos ao DNA nos eritrócitos, mostrou que o surfactante foi genotóxico em todas as concentrações avaliadas, porém a oxidação de bases não foi o mecanismo dominante de danos observados. O POEA não alterou a osmolalidade, as concentrações plasmáticas de sódio, cloreto e glicose e tampouco interferiu na atividade branquial da Na⁺/K⁺-ATPase e atividade hepática da glutaciona redutase (GR). Assim conclui-se que o POEA promoveu efeitos tóxicos no peixe *P. lineatus* provavelmente associados a um estado pró-oxidante. Na segunda parte do trabalho, peixes jovens pré-expostos a 0,15 mg.L⁻¹ de POEA (grupo POEA + Estresse) ou apenas à água (grupo Estresse), durante 24 h, foram submetidos ao estresse aéreo por 3 min e amostrados imediatamente (t0) ou após 1, 3 e 6 h da exposição aérea (t1, t3 e t6). Simultaneamente, peixes expostos a 0,15 mg.L⁻¹ de POEA (grupo POEA) ou à água (grupo Controle), durante 24 h, foram amostrados (t0) ou transferidos de aquários, para serem amostrados após 1, 3 e 6 h da transferência (t1, t3 e t6). Os peixes foram amostrados para a análise de cortisol, glicose, Na⁺ e Cl⁻ plasmáticos, atividade branquial da Na⁺/K⁺-ATPase e dos parâmetros hematológicos: hematócrito, hemoglobina e número de eritrócitos por mm³ de sangue (RBC). Nos peixes do grupo POEA + estresse a resposta de estresse foi inibida, visto que em t1 e t3 a concentração de cortisol plasmático foi significativamente menor em relação aos animais do grupo Estresse e em t0, t1 e t3 a glicemia foi menor, em relação aos animais do grupo Estresse. A atividade da Na⁺/K⁺-ATPase e a concentração de Na⁺ se apresentaram diminuídas em t0, tanto para os peixes do grupo Estresse quanto do grupo POEA + Estresse, quando comparados aos peixes do grupo controle. Porém, para t1 somente os animais do grupo POEA + estresse apresentaram menor concentração de sódio e atividade da Na⁺/K⁺-ATPase. A concentração de cloreto permaneceu inalterada para todos os grupos e períodos avaliados. Para os parâmetros hematológicos os peixes do grupo Estresse apresentaram em t0 aumento de RBC, hematócrito e hemoglobina, os quais retornaram em seus valores basais em t1, t3 e t6. Tanto os animais do

grupo POEA quanto os do grupo POEA + Estresse apresentaram uma diminuição nos valores de RBC e hemoglobina para os quatro períodos avaliados. Estes resultados indicam que o POEA reduz as concentrações plasmáticas de cortisol, atuando como desregulador endócrino e prejudicando a resposta de estresse de *P. lineatus*. Baseado no presente estudo pode-se concluir que peixes pré-expostos ao surfactante POEA não são capazes de responder a qualquer estressor adicional.

Palavras-chave: Biotransformação. Desregulação endócrina. Danos no DNA. Estresse oxidativo. Osmorregulação.

NAVARRO, C.D.C. **Effects of the surfactant polyoxyethylene amine (POEA) on genetic, biochemical and physiological parameters of teleost *Prochilodus lineatus***. 2013. 81p. Dissertation (Multicentric Post-Graduation Program in Physiological Sciences - Master) – State University of Londrina, Londrina.

ABSTRACT

The non-ionic surfactant polyoxyethylene amine (POEA) is added in numerous formulations of glyphosate based herbicides, which are widely used in various types of crops and may contaminate aquatic ecosystems. Thus, this work was performed in two parts in order to evaluate the possible POEA effects (i) on biochemical, genetic and physiological parameters and (ii) in the stress response of the freshwater Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. For the first part of the work juvenile fish were exposed to 0.15 mg.L⁻¹ (POEA 1), 0.75 mg.L⁻¹ (POEA 2) and 1.5 mg.L⁻¹ (POEA 3) of POEA or only to water (CTR) and after 24 h exposure animals were sampled to collect blood, liver and gills. In relation to CTR group, fish exposed to POEA 2 and POEA 3 showed an increase in liver activity of the biotransformation phase I enzyme 7 ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) and in the hepatic content of the non-enzymatic antioxidant reduced glutathione (GSH), while the liver activity of the biotransformation phase II enzyme glutathione S transferase (GST) showed a decrease. On the other hand, fish from POEA 1 group showed in the liver an increase the activity of superoxide dismutase (SOD) and in lipoperoxidation. Fish from POEA 3 also showed an increase in the hepatic activity of glutathione peroxidase (GPx) and a decrease in plasma cortisol. The exposure to all three concentrations of POEA lead to an increase in plasma concentrations of lactate and a decrease of liver catalase activity (CAT) and in the number of red blood cells (RBC) and hemoglobin content. The comet assay, used to evaluate DNA damage in erythrocytes, showed that all concentrations of the surfactant were genotoxic, however the oxidation of bases was not the main mechanism responsible for the damages. POEA did not change osmolality, plasma concentration of sodium, chloride and glucose and did not interfere on the gill activity of Na⁺/K⁺-ATPase and on liver activity of glutathione reductase (GR). Thus, we concluded that POEA promoted toxic effects on *P. lineatus* probably associated with a pro-oxidant status. In the second part of this work, fish pre-exposed to 0.15 mg.L⁻¹ of POEA (POEA + stress group) or only to water (stress group), during 24 h, were submitted to air stress for 3 min and immediately sampled (t0) or sampled after 1, 3 and 6 h of air exposure (t1, t3 and t6). Simultaneously, fish exposed to 0.15 mg.L⁻¹ of POEA (POEA group) or to water (Control group), during 24 h, were sampled (t0) or transferred to other aquaria to be sampled after 1, 3 and 6 h after the transference (t1, t3 and t6). Fish were sampled for the analysis of plasma cortisol, glucose, Na⁺ and Cl⁻, gill activity of Na⁺/K⁺-ATPase and of the hematologic parameters: hematocrit, hemoglobin and number of red blood cells per mm³ of blood (RBC). In fish from the group POEA + stress the stress response was inhibited, once at t1 and t3 plasma cortisol was significantly lower than in fish from the stress group and at t0, t1 and t3 plasma glucose was lower than in fish from the stress group. Na⁺/K⁺-ATPase activity and Na⁺ concentrations were lower at t0, in fish from the stress group as well as in fish from the group POEA + stress, in comparison to fish from the control group. However, at t1 only fish from the group POEA + stress showed lower Na⁺ concentration and Na⁺/K⁺-ATPase activity than in fish from the control group. Cl⁻ concentrations remained unaltered among all the groups of fish at all experimental periods. Fish from stress group showed at t0 increase in RBC, hematocrit and hemoglobin, which returned to basal levels at t1, t3 and t6. Animals from POEA and POEA + stress groups showed reduced values of RBC and hemoglobin at all the experimental periods. These results clearly indicate that POEA reduces plasma cortisol, acting as an endocrine disruptor impairing the stress response of *P. lineatus*. Thus we can conclude that fish pre exposed to POEA are not able to respond to any other additional stressor.

Key-words: Biotransformation. DNA damage. Endocrine disruption. Osmoregulation. Oxidative stress.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	AGROTÓXICOS NO BRASIL	15
2.2	SURFACTANTES ASSOCIADOS AOS HERBICIDAS	18
2.3	TOXICIDADE DO SURFACTANTE POEA	19
2.4	A UTILIZAÇÃO DE BIOINDICADORES NA TOXICOLOGIA AQUÁTICA	21
2.5	PROCHILODUS LINEATUS COMO MODELO BIOLÓGICO EM TESTES DE TOXICIDADE	22
2.6	BIOMARCADORES	23
2.7	BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS	24
2.7.1	Biotransformação	24
2.7.2	Geração de Espécies Reativas de Oxigênio e Defesas Antioxidantes	26
2.7.3	Estresse Oxidativo	29
2.7.4	Peroxidação Lipídica	30
2.8	BIOMARCADORES GENOTÓXICOS	32
2.9	PARÂMETROS FISIOLÓGICOS	33
2.9.1	Parâmetros Hematológicos	33
2.9.2	Parâmetros Osmorregulatórios	33
2.9.3	Resposta de Estresse e Cortisol	35
3	OBJETIVOS	39
3.1	OBJETIVO GERAL	39
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
4	EFEITOS DO SURFACTANTE POLIOXIETILENO AMINA (POEA) EM PARÂMETROS BIOQUÍMICOS , GENÉTICOS E FISIOLÓGICOS DO TELEÓSTEO PROCHILODUS LINEATUS	40
4.1	MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1.1	Animais	40
4.1.2	Delineamento Experimental e Amostragem	40
4.1.3	Parâmetros Fisiológicos	41
4.1.4	Parâmetros Bioquímicos	42
4.1.4.1	<i>Enzimas de biotransformação</i>	42
4.1.4.2	<i>Enzimas antioxidantes</i>	42
4.1.4.3	<i>Antioxidantes não enzimáticos</i>	43

4.1.4.4	<i>Peroxidação lipídica</i>	43
4.1.5	Análises Genéticas – Ensaio do Cometa	43
4.1.6	Análise Estatística	44
4.2	RESULTADOS	45
4.2.1	Parâmetros Bioquímicos	45
4.2.2	Danos no DNA – Ensaio do Cometa.....	48
4.2.3	Parâmetros Fisiológicos	49
4.3	DISCUSSÃO	52
5	INTERFERÊNCIA DO SURFACTANTE POLIOXIETILENO AMINA (POEA) NA RESPOSTA DE ESTRESSE DO TELEÓSTEO PROCHILODUS LINEATUS	58
5.1	MATERIAL E MÉTODOS	58
5.1.1	Animais	58
5.1.2	Delineamento Experimental e Amostragem.....	58
5.1.3	Parâmetros Fisiológicos	60
5.1.4	Análise Estatística	61
5.2	RESULTADOS	61
5.2.1	Resposta de Estresse.....	61
5.2.2	Interferência do POEA na Resposta de Estresse	62
5.2.3	Exposição ao POEA.....	64
5.3	DISCUSSÃO	65
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	69
	REFERÊNCIAS	71

1 INTRODUÇÃO

Os herbicidas representam um grupo de produtos químicos de alto risco ao ambiente devido à sua crescente utilização e, conseqüentemente, sua ampla presença nos ambientes aquáticos (Dores e De-Lamonica-Freire, 2001; Tsui e Chu, 2003) e sua alta capacidade de afetar organismos não alvos, como os peixes (Coppatti et al., 2009). Além do ingrediente ativo, são acrescentados às formulações de herbicidas compostos chamados de adjuvantes, que auxiliam ou modificam a ação do ingrediente principal, para aumentar a eficácia do produto comercializado (Foy, 1987). Dentre o grande e heterogêneo grupo de substâncias adjuvantes, os surfactantes não iônicos merecem destaque pela grande utilização (Foy, 1996). Entretanto, são poucos os dados sobre os riscos e toxicidade ambiental destes compostos (Krogh et al., 2003). A avaliação da toxicidade das formulações de herbicidas é feita quase exclusivamente baseada no ingrediente ativo, enquanto que os possíveis efeitos dos compostos adjuvantes são ignorados pelos toxicologistas ambientais e agências de proteção ambiental (Guilherme et al., 2012a).

Dentre uma grande variedade de herbicidas, merecem destaque aqueles à base de glifosato. Este ingrediente ativo ocupa o primeiro lugar no “*ranking*” de comercialização de herbicidas no Brasil e foi responsável por 76% da comercialização de herbicidas no país em 2009 (IBAMA, 2010). Dada a sua grande utilização este composto tem sido muito estudado em termos de segurança ambiental e saúde humana. As principais agências regulatórias e organizações científicas (Health Canada, 1991; EPA, 1993; WHO, 1994; EC, 2002) indicam baixa toxicidade e risco ambiental decorrente da exposição direta ao glifosato. No entanto, vários autores apontam maior toxicidade dos produtos formulados à base de glifosato como, por exemplo, o Roundup[®] (Tsui e Chu, 2003; Howe et al., 2004).

O Roundup[®] é um herbicida de amplo espectro e aparece como uma das formulações comerciais mais populares em todo mundo, utilizado na agricultura, jardins ornamentais e para controle de plantas aquáticas (Giesy et al., 2000). Além do glifosato como ingrediente ativo, o Roundup[®] possui na sua formulação o surfactante não iônico polioxietileno amina (POEA), o qual parece estar diretamente relacionado com o aumento da toxicidade do produto comercializado (Amarante Junior et al., 2002; Tsui e Chu, 2003; Howe et al., 2004). Vários estudos já demonstraram, pela determinação da concentração letal média (CL₅₀) para organismos aquáticos, que o POEA é mais tóxico que o ingrediente ativo e o próprio produto formulado (Giesy et al., 2000; Tsui e Chu, 2003). Além de sua alta toxicidade, o surfactante pode ser considerado um potencial contaminante para ambientes aquáticos, pois a persistência nestes ambientes, que varia entre 21 a 42 dias, é consideravelmente maior que a meia vida do próprio ingrediente ativo, que varia de 7 a 14 dias (Giesy et al., 2000). Apesar da indicação da elevada toxicidade do POEA para organismos não alvos, ainda são escassos os trabalhos relacionados aos efeitos subletais deste surfactante.

O emprego de testes de toxicidade com organismos aquáticos constitui uma ferramenta efetiva para a avaliação dos efeitos dos poluentes sobre os organismos. A espécie de peixe dulcícola neotropical *Prochilodus lineatus* é comumente encontrada nas regiões Sul e Sudeste do Brasil e tem sido bastante utilizada em estudos ecotoxicológicos, devido à sua sensibilidade a uma ampla variedade de classes de poluentes ambientais como os herbicidas (Modesto e Martinez, 2010ab; Paulino et al., 2012), metais (Carvalho e Fernandes, 2008) e outros compostos orgânicos (Simonato et al., 2011; Garcia e Martinez, 2012).

A biotransformação de xenobióticos é um processo que envolve sistemas enzimáticos e consiste na alteração estrutural de um composto químico com caráter lipofílico em hidrofílico. Em peixes, as enzimas da subfamília CYP1A do complexo citocromo P450 atuam na fase I do processo de biotransformação para uma ampla variedade de xenobióticos. A indução desta enzima por contaminantes é mais comumente mensurada por meio da atividade da etoxiresorufina-O-desetilase (EROD) (Whyte et al., 2000). Alguns trabalhos já mostraram a alteração na EROD após a exposição de peixes a contaminantes orgânicos (Arukwe et al., 2008; Simonato et al., 2011). Na fase II do processo de biotransformação, a enzima glutationa-S-transferase (GST) catalisa a conjugação dos produtos resultantes da fase I com compostos endógenos como o tripeptídeo glutationa (GSH). Esta conjugação aumenta a hidrossolubilidade destes contaminantes facilitando sua eliminação (Di Giulio et al., 1995) e consequentemente reduz a probabilidade destes produtos tóxicos se ligarem a outras macromoléculas celulares (Stegeman et al., 1992). A toxicidade de muitos contaminantes pode ser modulada pela indução na atividade da GST (Carletti et al., 2008), entretanto, peixes expostos ao herbicida Roundup[®] podem apresentar uma redução na atividade desta enzima (Lushchak et al., 2009; Modesto e Martinez, 2010a; Menezes et al., 2011).

Muitos poluentes podem induzir a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Ahmad et al., 2000), dentre eles o peróxido de hidrogênio, o ânion superóxido e o radical hidroxil. Devido à alta reatividade, estas ERO podem interagir com lipídeos, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos e provocar danos oxidativos (Hermes Lima, 2004). A fim de promover a neutralização destas espécies os organismos aeróbicos possuem defesas constituídas por enzimas antioxidantes, tais como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutationa peroxidase (GPx) e a glutationa redutase (GR), assim como antioxidantes não enzimáticos como a glutationa (GSH).

A ocorrência de danos oxidativos se dá quando as defesas antioxidantes do animal são insuficientes para neutralizar as ERO, promovendo o estresse oxidativo, que está relacionado com vários processos patológicos, incluindo a peroxidação lipídica (LPO) e danos ao DNA. Tanto a indução de LPO (Guilherme et al., 2010; Modesto e Martinez, 2010ab; Menezes et al., 2011; Rossi et al., 2011) quanto os efeitos genotóxicos (Cavalcante et al., 2008; Ghisi e Cestari, 2012; Guilherme et al., 2012b) do Roundup[®] já foram descritos para uma variedade de peixes, porém, ainda não está clara a contribuição do surfactante para estes efeitos das formulações.

Alterações nos parâmetros hematológicos após a exposição de peixes a substâncias tóxicas são frequentemente utilizadas para a avaliação da saúde do peixe (Martinez e Souza, 2002). Estudos mostram a capacidade do Roundup[®] de interferir nos parâmetros sanguíneos de peixes (Gluszczak et al., 2006; Modesto e Martinez, 2010a), e embora não sejam respostas específicas, os parâmetros hematológicos podem ser considerados bons indicadores de toxicidade, por sua sensibilidade a uma variedade de contaminantes (Van der Oost et al., 2003).

Os teleosteos dulcícolas são hiperosmóticos em relação ao meio externo, por isso precisam constantemente enfrentar o influxo osmótico de água e perda de íons, eliminando o excesso de água através de uma urina diluída e abundante e absorvendo os íons ativamente pelas brânquias, principalmente pelas células cloreto (Heath, 1995; Evans et al., 2005). A exposição de peixes de água doce a contaminantes pode provocar alterações no processo de hiperregulação, e desta forma a avaliação das concentrações de íons como o sódio, potássio e o cloreto podem ser parâmetros indicativos de desequilíbrios osmorregulatórios (Barton e Iwana, 1991; Heath, 1995). A Na^+/K^+ - ATPase (NKA) está presente em grandes quantidades na membrana basolateral das células cloreto e possui grande importância na tomada de íons, uma vez que está relacionada à manutenção intracelular dos íons sódio e potássio e na geração de potencial eletroquímico para a absorção de sódio e cloreto (Gonzalez et al., 2006; Ligwood et al., 2006). Estudos relatam que a exposição de peixes a herbicidas pode promover alterações na atividade desta enzima (Nascimento et al., 2012).

Na presença de agentes estressores, o organismo reage desencadeando uma série de reações conhecidas como resposta ao estresse. A resposta de estresse é tida como um conjunto de alterações fisiológicas que possuem o objetivo de restabelecer uma condição de homeostasia. Inicialmente, um estímulo do sistema nervoso central desencadeia a liberação imediata de hormônios como adrenalina e noradrenalina e o cortisol (Barton, 2002). A liberação destes hormônios acarretará em ações e efeitos imediatos em nível sanguíneo e tecidual, os quais são caracterizados como resposta secundária. Elevação da glicemia, relatada em muitas espécies de peixes, é uma das respostas secundárias mais utilizadas para a quantificação de estresse nestes organismos (Barton e Iwana, 1991; Wendelaar Bonga, 1997). Outras alterações causadas pelo estresse em peixes, as quais também qualificam as respostas secundárias são as alterações hematológicas e as osmorregulatórias (McDonald e Milligan, 1997). Alguns estudos apontam a capacidade de determinados compostos químicos mimetizarem hormônios ou exercerem atividade de desregulação endócrina (Cericato et al., 2008; Cericato et al., 2009; Nascimento et al., 2012), acarretando no comprometimento da resposta ao estresse o que pode afetar negativamente a saúde dos peixes (Cericato et al., 2009).

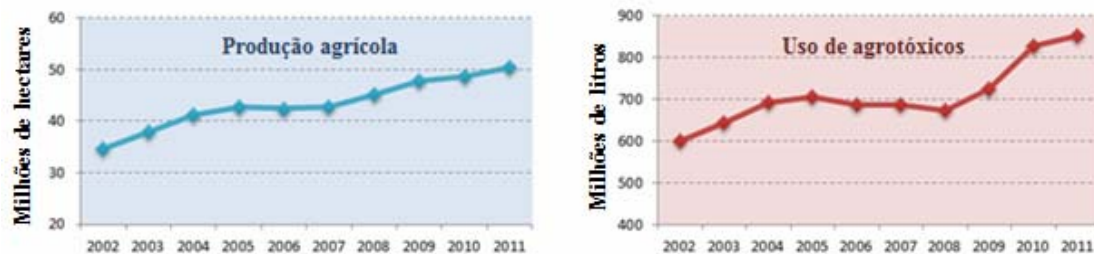
Assim, considerando-se a necessidade de se conhecer o potencial tóxico do surfactante POEA para peixes devido à elevada utilização de herbicidas à base de glifosato, como o Roundup[®], o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do surfactante sobre parâmetros bioquímicos, genotóxicos e fisiológicos e na resposta de estresse da espécie *P. lineatus*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 AGROTÓXICOS NO BRASIL

No Brasil, a crescente utilização de agrotóxicos na agricultura é justificada pelo aumento da produção agrícola (Figura 1), sendo esta relacionada ao aumento populacional e ao importante papel exercido pelo Brasil na exportação agrícola mundial (IBAMA, 2010). Dados na literatura apontam que enquanto nos últimos dez anos o mercado mundial de agrotóxicos cresceu 93%, o mercado brasileiro cresceu 190% (ANVISA e UFPR, 2012). Em 2008, o Brasil assumiu o posto de maior consumidor de agrotóxicos do mundo. Em 2010, o mercado nacional movimentou cerca de US\$ 7,3 bilhões e representou 19% do mercado mundial de agrotóxicos, ficando a frente dos Estados Unidos, responsável por 17% deste mercado. Em 2011 houve um aumento de 16,3% nas vendas de agrotóxicos no Brasil, alcançando US\$ 8,5 bilhões e as lavouras de soja, milho, algodão e cana-de-açúcar representam 80% do total das vendas no país (ANVISA e UFPR, 2012).

Figura 1 – Produção agrícola brasileira das quatro principais lavouras: soja, milho, algodão e cana-de-açúcar e a utilização de agrotóxicos nas lavouras do Brasil no período de 2002 a 2011 (Fonte: Adaptado de Carneiro et al., 2012).

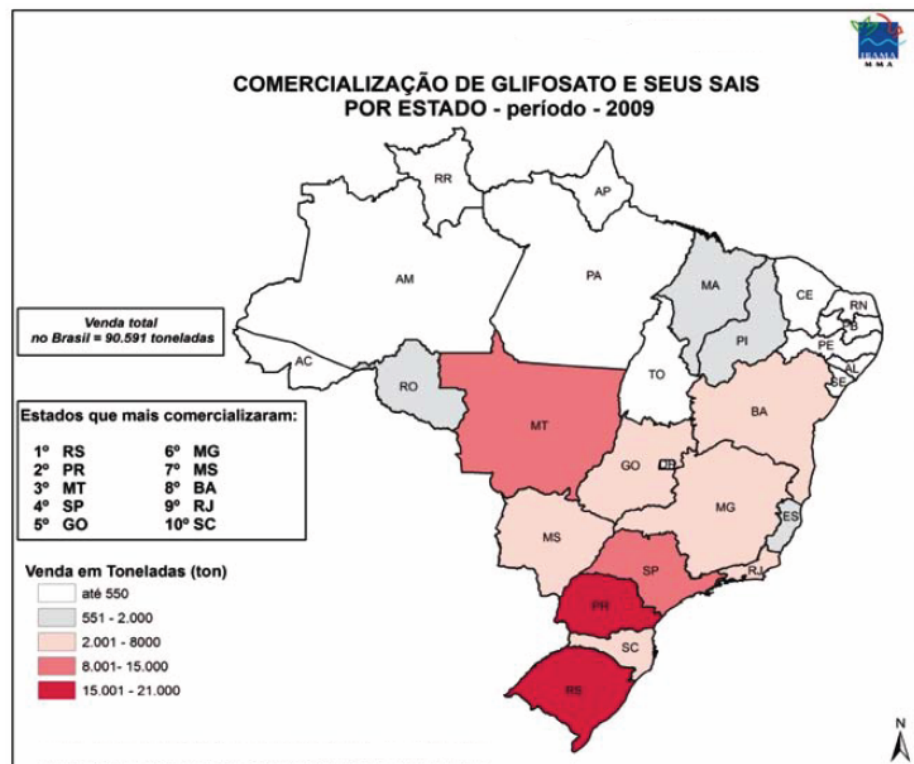


Segundo dados divulgados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA e UFPR, 2012), existe uma concentração no mercado de agrotóxicos de determinadas categorias de produtos, dentre eles destacam-se os herbicidas, que representam 45% do total de agrotóxicos comercializados no país. Os herbicidas são substâncias químicas que evitam, reduzem ou eliminam plantas invasoras, conhecidas popularmente como “ervas daninhas”, e o controle destas plantas é uma prática de elevada importância para a obtenção de altos rendimentos na produção agrícola. O maior consumo desta classe de agrotóxicos ocorre principalmente em virtude da expansão da fronteira agrícola e do aumento de terras onde é praticado o plantio direto, desta forma, os herbicidas representam um grupo de produtos químicos de alto risco ao ambiente devido à sua crescente utilização e, conseqüentemente, sua presença nos ambientes aquáticos (Dores e DeLamonica-Freire, 2001; Tsui e Chu, 2003) e capacidade de afetar organismos não alvos, como os peixes (Coppatti et al., 2009). Além do ingrediente ativo são acrescentados às formulações de

herbicidas compostos chamados de adjuvantes, que auxiliam ou modificam a ação do ingrediente principal, para aumentar a eficácia do produto comercializado (Foy, 1987). Dentre o grande e heterogêneo grupo de substâncias adjuvantes, os surfactantes não iônicos merecem destaque pela grande utilização (Foy, 1996). Entretanto, são poucos os dados relacionados aos riscos e toxicidade ambiental destes compostos (Krogh et al., 2003). A avaliação da toxicidade das formulações de herbicidas é feita quase exclusivamente baseada no ingrediente ativo, enquanto que os possíveis efeitos dos compostos adjuvantes são ignorados pelos toxicologistas ambientais e agências de proteção (Guilherme et al., 2012a).

Dentre uma ampla variedade de herbicidas, merecem destaque aqueles que possuem em sua formulação o glifosato como ingrediente ativo. No mercado de herbicidas, o consumo destes produtos em 2009 ultrapassou 90 mil toneladas, o que representa 76% do total de herbicidas comercializados no país (IBAMA, 2010). A Figura 2 representa a distribuição da comercialização de herbicidas à base de glifosato no país, destacando-se os estados do Rio Grande do Sul e Paraná como os maiores consumidores deste ingrediente ativo.

Figura 2 – Distribuição da comercialização do ingrediente ativo glifosato, por estados, em 2009 (Fonte: Sistema de Agrotóxicos – Relatórios Semestrais – IBAMA, 2010).



O alto consumo destes herbicidas não está restrito ao Brasil, estes produtos também são muito consumidos em todo o mundo, e conseqüentemente o glifosato é uma importante fonte de contaminação ambiental, sendo detectado em diferentes compartimentos ambientais tais como o solo e

corpos d'água (Giesy et al., 2000). Diante do amplo consumo do glifosato e de sua presença em diferentes ecossistemas é que este ingrediente ativo tem sido muito estudado em termos de segurança ambiental e saúde humana. As principais agências regulatórias e organizações científicas (Health Canadá, 1991; EPA, 1993; WHO, 1994; EC, 2002) indicam uma baixa toxicidade e risco ambiental decorrente da exposição direta ao glifosato. No entanto, apesar de sua toxicidade relativamente baixa, alguns produtos formulados à base de glifosato como, por exemplo, o Roundup[®], apresentam uma toxicidade consideravelmente maior que o ingrediente ativo (Tsui e Chu, 2003; Howe et al., 2004).

O Roundup[®] é um herbicida de amplo espectro e aparece como uma das formulações comerciais mais populares em todo mundo, utilizado na agricultura, jardins ornamentais e para controle de plantas aquáticas (Giesy et al., 2000). Além do glifosato como ingrediente ativo, o Roundup[®] possui na formulação o surfactante não iônico polioxietileno amina (POEA), o qual parece estar diretamente relacionado ao aumento da toxicidade do produto comercializado (Amarante Junior et al., 2002; Tsui e Chu, 2003; Howe et al., 2004) O surfactante POEA está presente em uma proporção de 15% do produto e trata-se de uma mistura de alquilaminas polietoxiladas, as quais são sintetizadas a partir de ácidos graxos de origem animal (Giesy et al., 2000). Esta mistura contém uma variedade de ácidos graxos, incluindo o ácido oleico (37-43%), palmítico (24-32%), esteárico (20-25%), mirístico (3-6%) e linoleico (2-3%), bem como pequenas quantidades de colesterol, ácido araquidônico, elaídico e vacênico (Budavari, 1989 apud Diamond e Durkin, 1997). Este surfactante apresenta como impureza o 1,4 dioxano, um composto químico altamente cancerígeno (Diamond e Durkin, 1997). É importante citar que este surfactante é predominantemente utilizado em produtos à base de glifosato (Giesy et al., 2000), ou seja, o uso do POEA não está restrito à formulação comercial do Roundup[®]. Entretanto, um ponto limitante quanto às informações dos surfactantes acrescentados a formulações destes herbicidas é o fato de que os fabricantes não divulgam quais e quanto destes surfactantes estão sendo acrescentados ao produto comercializado. Estes compostos são generalizados na bula como “compostos inertes” (Figura 3), uma nítida forma de camuflar a real composição destes herbicidas.

Figura 3 – Composição do herbicida a base de glifosato Roundup[®], em destaque compostos acrescentados a estas formulações tidos como ingredientes inertes, dentre os quais o surfactante polioxietileno amina (POEA) (Fonte: Bula Roundup[®], Monsanto).

BROU20/1012-00



Roundup original[®]

**REGISTRADO NO MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,
PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA SOB Nº 00898793**

COMPOSIÇÃO:

Sal de Isopropilamina de N - (fosfonometil) glicina	480 g/L (48,0% m/v)
Equivalente ácido de N - (fosfonometil) glicina (GLIFOSATO)	360 g/L (36,0% m/v)
Ingredientes inertes	684 g/L (68,4% m/v)

2.2 SURFACTANTES ASSOCIADOS AOS HERBICIDAS

Os surfactantes constituem a gama mais ampla de adjuvantes, considerando adjuvantes como uma combinação de substâncias químicas biologicamente ativas destinadas a facilitar e/ou melhorar a mistura, aplicação e efetividade de herbicidas por meio de interações químicas ou físicas entre tais compostos e o organismo alvo (Tu e Randall, 2003; Ducar et al., 2003).

A estrutura molecular dos surfactantes consiste em uma porção hidrofóbica, a qual é representada pela cauda de hidrocarboneto apolar e de uma porção hidrofílica que é representado por um grupo de cabeça polar (Figura 4), caracterizando tais compostos como anfipáticos, ou seja, combinam propriedades hidrófilas e hidrófobas em uma mesma molécula, o que permite a formação de um filme molecular, ordenado nas interfaces, para romper a tensão superficial e interfacial da água (Nitschke e Pastore, 2002). A melhor eficácia dos herbicidas frente à adição de surfactantes ao produto formulado pode ser explicada por diferentes mecanismos como: redução da tensão superficial da gota pulverizada, o que permite a diminuição do tamanho da mesma e facilita a emulsificação, dispersão, aspersão, aderência e/ou ação do herbicida. Diante disto, o surfactante maximiza a dispersão da gota sobre a folha e, deste modo, permite uma distribuição homogênea e completa do herbicida sobre a superfície foliar (Tu e Randall, 2003; Devendra et al., 2004). O surfactante pode auxiliar na disponibilidade do herbicida ao prevenir a cristalização, volatilização, ionização e formação de sais e outros compostos do herbicida, e alterar o coeficiente de difusão da molécula do herbicida e sua mobilidade (Devendra et al., 2004), o que permite que compostos hidrofílicos, ou seja, aqueles que são pouco lipossolúveis, possam atravessar a cutícula serosa das folhas.

Figura 4 – Ilustração esquemática da estrutura do surfactante.



Surfactantes se classificam de acordo com a carga do grupo polar da molécula e, diante disto, são divididas em quatro classes: aniônicos, catiônicos, anfóteros e não-iónicos. Dentre as diferentes classes de surfactantes, os mais frequentemente utilizados nas formulações de herbicidas são os não iônicos, entre eles o POEA. Os surfactantes não iônicos são derivados do polioxietileno e polioxipropileno (de compostos com alquil fenol e álcool, ésteres de ácidos graxos, alquilaminas, amidas e mercaptanas) ou poliálcoóis, ésteres de carboidratos, amidas de álcoois graxos e óxidos de amidas graxas (Fendler et al., 1972). Em sua apresentação comercial, estes surfactantes são normalmente uma mistura de estruturas homólogas, as quais diferem no número de carbonos da cadeia alquil e no monômero da cabeça polar (Madsen et al., 2001). A toxicidade de surfactantes não iônicos parece estar diretamente relacionada ao comprimento da cadeia carbônica (grupo etoxi) (Talmage, 1994), sendo assim, as interações polares dependem da presença do grupo etoxi e o comportamento lipofílico está relacionado à cadeia alquil (Mezzanotte et al., 2002).

A classe de surfactantes não iônicos se caracteriza por: apresentar bom desempenho como detergentes, serem compatíveis a outros tipos de surfactantes, não apresentarem alterações em sua atividade mediante alterações na dureza e pH da água (Mezzanotte et al., 2002) e apresentarem baixa capacidade na formação de espuma, características que tornam estes surfactantes os mais utilizados nas formulações de agroquímicos.

2.3 TOXICIDADE DO SURFACTANTE POEA

Diante do aumento no consumo de herbicidas à base de glifosato e a escassez de informações relacionadas aos riscos e toxicidade do surfactante POEA, cresce a preocupação sobre os efeitos tóxicos deste surfactante sobre a saúde humana e de outros organismos. Entretanto, ainda são poucos os estudos que tentam elucidar os possíveis efeitos específicos do surfactante em seres vivos. A maioria dos trabalhos aponta a toxicidade do produto formulado e do composto ativo (glifosato) e com bases nestes dados estimam a toxicidade do POEA, sem avaliar os efeitos deste composto sobre os organismos.

No estudo de Birch (1977) apud Willians e colaboradores (2000), a toxicidade aguda do POEA em ratos e coelhos foi avaliada. Os valores da dose letal média (DL_{50}) para o surfactante, via oral para ratos e dérmica para coelhos, foram relatados como 1200 e 1260 $mg.Kg^{-1}$, respectivamente. Baseado nestes resultados, o POEA se enquadra na categoria III da classificação dos ingredientes inertes quanto a sua toxicidade, é considerado pouco tóxico (Willians et al., 2000) e não representa um perigo de toxicidade aguda para a saúde humana. No entanto há controvérsias quanto a esta afirmação, pois outros dados relatam que o surfactante é severamente irritante para a pele e corrosivo para os olhos de coelhos (Birch, 1977 apud Willians et al., 2000) e a instilação traqueal em ratos resultou em efeitos tóxicos nas doses de 0,1, 0,2 e 0,4 $mg/animal$ do POEA, causando 20%, 70% e 100% de mortalidade, bem como aumento no peso dos pulmões (Martinez e Brown, 1991).

Trabalhos que investiguem a toxicidade do POEA para organismos aquáticos também são escassos. É importante ressaltar que o surfactante pode ser considerado um potencial contaminante para ambientes aquáticos, pois a persistência nestes ambientes, que varia entre 21 e 42 dias, é consideravelmente maior que a meia vida do próprio ingrediente ativo, que varia de 7 a 14 dias (Giesy et al., 2000). Dada a carência de informações sobre os efeitos do POEA para peixes dulcícolas neotropicais, estudos experimentais sobre o impacto do POEA nos ecossistemas aquáticos em espécies nativas se tornam necessários. A grande maioria dos estudos encontrados na literatura associando espécies aquáticas e o POEA teve o objetivo de determinar a toxicidade aguda do surfactante por meio da concentração letal média (CL_{50}) e compara-la à CL_{50} do ingrediente ativo e do produto formulado. Em estudo com truta arco-íris, Giesy e colaboradores (2000) encontraram valores de CL_{50} para a formulação Roundup® entre 8,7 e 27 $mg.L^{-1}$, para o ingrediente ativo, glifosato, entre 140 e 240 $mg.L^{-1}$ e para o surfactante POEA entre 0,65 e 7,4 $mg.L^{-1}$. Baseados nestes dados, pode se concluir que o componente mais tóxico da formulação para truta arco-íris é o surfactante POEA. Um segundo estudo foi o de Tsui e Chu (2003), no qual os autores analisaram a toxicidade e a contribuição de todos os compostos presentes na formulação do herbicida Roundup®. Foram analisados: glifosato, sal de isopropilamina de glifosato (IPA), o surfactante e também o produto formulado, Roundup®, os quais foram testados em sete organismos aquáticos de quatro grandes grupos taxonômicos (bactérias, algas, protozoários e crustáceos). Em geral, a ordem de toxicidade dos químicos foi: POEA > Roundup® > glifosato > IPA. Os resultados deste trabalho apontam que a toxicidade do produto formulado para organismos aquáticos, pode ser atribuída ao surfactante POEA. Recentemente, foi publicado o primeiro estudo reportando os efeitos do POEA utilizando biomarcadores genéticos com organismos aquáticos (Guilherme et al., 2012a). O estudo avaliou a contribuição relativa do glifosato e do POEA para a genotoxicidade da formulação Roundup® para a espécie de enguia, *Anguilla anguilla*. Os animais foram expostos ao Roundup® (58, 116 $\mu g.L^{-1}$), glifosato (17,9, 35,7 $\mu g.L^{-1}$) e POEA (9,3, 18,6 $\mu g.L^{-1}$) durante 1 e 3 dias. Os resultados confirmaram a genotoxicidade do herbicida, apontando para o potencial genotóxico do surfactante POEA.

Desse modo, frente escassez de informações dos efeitos subletais do surfactante e sua alta toxicidade para organismos aquáticos, fica clara a necessidade de estudos experimentais para avaliar os efeitos deste surfactante em espécies aquáticas nativas.

2.4 A UTILIZAÇÃO DE BIOINDICADORES NA TOXICOLOGIA AQUÁTICA

Bioindicadores são definidos como os organismos que fornecem informações sobre as condições ambientais de seu habitat, seja pela presença ou ausência, pelo comportamento (Van Gestel e Van Brummelen, 1996; Van der Oost et al., 2003) ou por alterações em funções vitais e/ou composição química frente à presença de contaminantes (Totti et al., 2007). O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA – resolução nº 357/2005) determina que a qualidade dos ambientes aquáticos seja avaliada por indicadores biológicos, utilizando-se organismos e/ou comunidades aquáticas como instrumentos para monitorar e avaliar a situação de corpos d'água.

A toxicologia aquática pode ser definida como o estudo dos efeitos adversos de contaminantes do ambiente sobre os organismos aquáticos (Rand e Petrocelli, 1985). Esta ciência constitui uma importante ferramenta utilizada nas avaliações dos impactos de poluentes sobre a biota aquática. O emprego de testes toxicológicos na avaliação dos efeitos quantitativos e qualitativos dos contaminantes nos organismos aquáticos tem contribuído na determinação da quantidade máxima de agentes tóxicos que podem ser tolerados no ambiente, sem que estes causem danos significativos à biota. Com base nesses trabalhos é possível estabelecer limites de concentração de substâncias tóxicas aceitáveis no ambiente (Rand e Petrocelli, 1985; Rand, 1995). Os estudos de toxicologia aquática baseiam-se no desenvolvimento de dois principais testes experimentais: testes de toxicidade aguda e testes de toxicidade crônica. Vários grupos de animais têm sido empregados em testes de toxicidade, gerando subsídios importantes para a avaliação e caracterização dos efeitos agudos e crônicos de diversos agentes tóxicos presentes no ambiente. Entre os organismos aquáticos, os peixes têm ocupado uma importante posição no campo da toxicologia (Di Giulio e Hinton, 2008), constituindo assim, um grupo de grande importância nas avaliações de toxicidade ambiental, pois apresentam ampla distribuição geográfica e participam de diferentes níveis tróficos, sendo considerados excelentes bioindicadores. Os efeitos dos contaminantes nos peixes e em outros organismos aquáticos podem se manifestar em vários níveis de organização biológica, como molecular, bioquímico e genético e os testes de toxicidade são capazes de detectar essas alterações, cujos resultados podem servir de base para a aplicação de métodos e técnicas que ajudem a prevenir a ocorrência de alterações de alta relevância ecológica em que as populações e as comunidades são severamente afetadas (Wendelaar Bonga, 1997). Diante disto, o emprego de técnicas que apontam respostas em níveis mais baixos da organização biológica são as mais eficazes. No entanto, é importante citar o quanto ainda são escassos dados quanto aos testes de toxicidade com espécies nativas de peixes e assim, pouco se sabe sobre a

sensibilidade das espécies de peixes neotropicais a uma variedade de classes de poluentes em ecossistemas tropicais de água doce (Martinez et al., 2004).

2.5 *PROCHILODUS LINEATUS* COMO MODELO BIOLÓGICO EM TESTES DE TOXICIDADE

A espécie de peixe neotropical *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1847) (Figura 5) é nativa dos rios da América do Sul, e é considerada uma das espécies mais abundantes e importantes da região Sul e Sudeste do Brasil, com maior frequência na porção superior da bacia do rio Paraná, principalmente nos rios Grande, Pardo e Mogi-Guaçu (Leonhardt et al., 2002). De acordo com a classificação taxonômica, a espécie *P. lineatus* pertence à família Prochilodontidae, ordem Characiformes e superordem Ostariophysí. Este peixe, conhecido popularmente como curimba, possui o corpo recoberto por escamas e pode medir até 74 cm e pesar até 6 Kg (Castro e Vari, 2003). É uma espécie detritívora, e por se alimentar de detritos estes peixes ficam mais suscetíveis a substâncias químicas que, eventualmente, tenham ficado retidas no sedimento (Martinez e Cólus, 2002). Sabe-se que *P. lineatus* é uma espécie migratória de longas distâncias, podendo nadar centenas de quilômetros até sua área de desova (Shibatta et al., 2007), e portanto pode se expor a diferentes ambientes contaminados.

Vários trabalhos consideram esta espécie de peixe como sendo um bioindicador em potencial (Cavalcante et al., 2008; Simonato et al., 2008; Langiano e Martinez, 2008), uma vez que a sua distribuição está restrita a locais pouco impactados, possui importância econômica, biologia conhecida, e em testes de toxicidade se apresenta sensível a uma variedade de poluentes tais como: metais (Camargo et al., 2009; Nascimento et al., 2012), agrotóxicos (Langiano e Martinez, 2008; Modesto e Martinez, 2010a, 2010b; Paulino et al., 2012) e derivados de petróleo (Simonato et al., 2008; Simonato et al., 2011).

Figura 5 – Juvenil de *Prochilodus lineatus*.

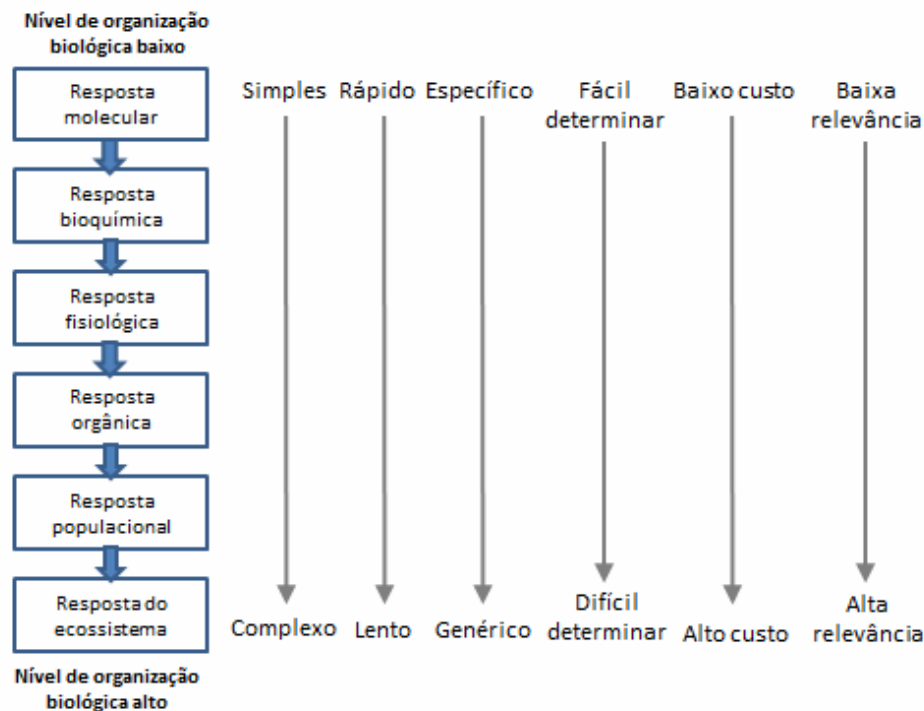


2.6 BIOMARCADORES

Os biomarcadores são definidos como variações induzidas por agentes tóxicos, medidas dentro do organismo ou em seus produtos (urina, fezes, etc), e indicam um desvio do estado normal (Van Gestel e Van Brummelen, 1996; Sarkar et al., 2006). A principal razão para sua utilização deve-se ao fato de fornecerem informações sobre os efeitos biológicos dos poluentes, bem como pistas sobre os mecanismos de ação dos contaminantes, e não restringem a contaminação ambiental apenas à quantificação destes poluentes no ambiente (Martinez, 2006). São ferramentas importantes para o monitoramento ambiental, uma vez que seu emprego é capaz de identificar efeitos dos contaminantes em níveis inferiores de organização biológica, que ocorrem mais rapidamente, antes que possam atingir níveis superiores, como comunidades e ecossistemas (Wendelaar Bonga, 1997). Este aviso antecipado detectado pelos biomarcadores, além de facilitar a compreensão sobre os efeitos dos contaminantes devido sua maior especificidade, quando comparado a níveis de organização superiores (Arias et al., 2007), é também utilizado como método preventivo, permitindo que estratégias de remediação sejam adotadas antes que ocorram danos ambientais e ecológicos irreversíveis (Cajaraville et al., 2000).

A eficiência dos biomarcadores como indicadores biológicos específicos para os estudos ecotoxicológicos já está bem definida (Figura 6), porém recomenda-se a utilização de diferentes tipos de biomarcadores simultaneamente, pois a avaliação de um único parâmetro pode resultar em interpretações errôneas, não demonstrando todos os danos que o contaminante pode causar ao organismo (Zorita et al., 2008). Atualmente, os biomarcadores frequentemente utilizados em estudos ecotoxicológicos são aqueles relacionados aos processos de biotransformação de xenobióticos, defesas antioxidantes e danos oxidativos e a processos fisiológicos, como as alterações nos níveis plasmáticos de íons, hormônios e glicemia, os quais serão tratados, com mais detalhes a seguir.

Figura 6 – Representação dos biomarcadores em diferentes níveis de organização biológica e os prós e contras associados à sua utilização (Adaptado de Lam, 2009).



2.7 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

2.7.1 Biotransformação

A biotransformação de xenobióticos é um processo que envolve sistemas enzimáticos e consiste na alteração estrutural de um composto químico com caráter lipofílico em hidrofílico. Este processo não se restringe a biotransformação de xenobióticos, uma vez que também exerce papel importante na transformação de compostos endógenos como os esteroides, ácidos biliares e ácidos graxos (Di Giulio et al., 1995). Quanto aos xenobióticos, muitos deles são lipofílicos e, portanto entram facilmente nas células através da membrana celular. A biotransformação converte estes compostos em metabólitos menos tóxicos e mais solúveis, conseqüentemente serão excretados com maior facilidade pelo organismo. Porém, é preciso realçar que nem sempre os produtos metabólicos gerados são de menor toxicidade, podendo estes se apresentarem mais tóxicos que o composto original (Van der Oost et al., 2003). Nos vertebrados, o fígado é o órgão mais rico em enzimas que catalisam as reações de biotransformação. Nos hepatócitos, essas enzimas estão localizadas principalmente no retículo endoplasmático, no citosol e em quantidades menores nas mitocôndrias, núcleos e lisossomos (Parkinson e Ogilvie, 2008).

A biotransformação é comumente dividida em duas fases. Durante a fase I, um grupo polar é introduzido à molécula, geralmente por reações de oxidação, redução ou hidrólise e,

embora esta reação aumente a solubilidade em água do xenobiótico, o efeito mais importante é torná-lo um substrato adequado para as reações de fase II. Nas reações de fase II, o composto previamente alterado é conjugado a substratos endógenos (Hodgson et al., 2008). Dependendo das características do xenobiótico a ser biotransformado, este pode passar pelas duas fases ou apenas por uma das fases.

O principal sistema enzimático envolvido na fase I de biotransformação é o sistema de monooxigenases do citocromo P450. Basicamente a reação catalisada pelo citocromo P450 é a monooxigenação, na qual um átomo de oxigênio molecular é introduzido ao substrato lipofílico (RH), que corresponde ao xenobiótico, e o outro é reduzido à água, os elétrons necessários para as reações de redução são fornecidos pelo NADPH. Por meio desta reação, o xenobiótico (RH) é convertido a um produto mais hidrossolúvel (ROH) (Martinez, 2006). Para peixes, a classe de isoenzimas da família do citocromo P450 responsável pela biotransformação de uma ampla variedade de xenobióticos, como os hidrocarbonetos poliaromáticos (PAHs), bifenilas policloradas (PCBs) entre outros, é a subfamília CYP1A. A indução da CYP1A em peixes expostos a compostos orgânicos já é bem estabelecida (Arukwe et al., 2008; Simonato et al., 2011) e está relacionada a um fator de transcrição citosólico conhecido como receptor aril-hidrocarboneto. A atividade da enzima etoxiresorufina-O-desetilase (EROD), que é mensurada pela conversão do substrato 7-etoxiresorufina em resorufina (Abrahamson et al., 2007), é catalisada predominantemente pela CYP1A em diversos vertebrados, e amplamente utilizada biomarcador associado à atividade da CYP1A.

A fase II da biotransformação consiste em reações que envolvem a conjugação do xenobiótico, na sua forma original ou seus metabólitos originados na fase I, com compostos endógenos, solúveis em água, presentes nas células (Hodgson et al., 2008), resultando no aumento da hidrofiliabilidade e das taxas de eliminação destes (Martinez, 2006). Entre várias moléculas endógenas, o tripeptídeo glutationa é utilizado na conjugação aos xenobióticos. As classes funcionais de compostos que são cataliticamente conjugados à glutationa incluem antibióticos, vasodilatadores, herbicidas, inseticidas, agentes anticancerígenos e cancerígenos (Hodgson et al., 2008). Este tripeptídeo além de ser utilizado como substrato para a reação de fase II da biotransformação, exerce importante papel na defesa antioxidante, sendo utilizado como substrato para a atividade da glutationa peroxidase (GPx) e como defesa antioxidante primária, reagindo diretamente com vários radicais contendo carbono e espécies reativas de oxigênio (Hermes Lima, 2004).

As glutationas S transferases (GSTs) são uma família de isoenzimas envolvidas na conjugação da glutationa em sua forma reduzida (GSH) com compostos eletrofílicos, tais como epóxidos, haloalcanos, nitroalcanos, alcanos, derivados de metil sulfóxido, organofosfatos, halo e nitro- compostos aromáticos (Hodgson et al., 2008). As GSTs são amplamente distribuídas em todas as formas de vida, incluindo bactérias, fungos, plantas e animais. Diferente das enzimas de fase I, as GSTs encontram-se mais ativas no citosol, sendo identificadas diferentes isoformas destas enzimas, sendo classificadas em Alpha, Mu, Pi, Sigma, Theta, Zeta e Omega. A medida da “atividade da GST total” é baseada na reação da GSH com o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CTNB), formando a glutationa

S-(2,4-dinitrofenil), que é quantificado a 340 nm. A atividade da enzima GST é extensamente utilizada como biomarcador e embora não seja tão sensível quanto às enzimas de fase I, a atividade da enzima GST também é utilizada como parâmetro indicativo da exposição de organismo, como por exemplo, peixes a contaminantes (Van der Oost et al., 2003). Além de exercerem o papel na conjugação, as GSTs também desempenham papéis adicionais no processo de detoxificação, e podem atuar como proteínas carreadoras, promovendo o transporte de compostos lipofílicos endógenos ou xenobióticos até os locais de ocorrência da biotransformação de fase I, são capazes de se ligarem a metabólitos gerados na fase I, prevenindo que estes se liguem a outras moléculas e tem papel na conjugação de produtos gerados na lipoperoxidação (Di Giulio et al., 1995).

2.7.2 Geração de Espécies Reativas de Oxigênio e Defesas Antioxidantes

O oxigênio molecular é essencial para a vida dos organismos aeróbicos, principalmente por participar da respiração mitocondrial para a produção de energia. A redução do oxigênio à água, consequência deste processo de respiração celular, requer quatro elétrons, e em razão da sua configuração eletrônica, o oxigênio tem forte tendência a receber um elétron de cada vez e esta conversão univalente do oxigênio ocorre sequencialmente (Figura 7). Os produtos intermediários destas reações são as espécies reativas de oxigênio (ERO) ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil ($\cdot OH$), e todas as formas de vida aeróbicas estão constantemente sujeitas aos efeitos oxidantes destes metabólitos reativos de oxigênio.

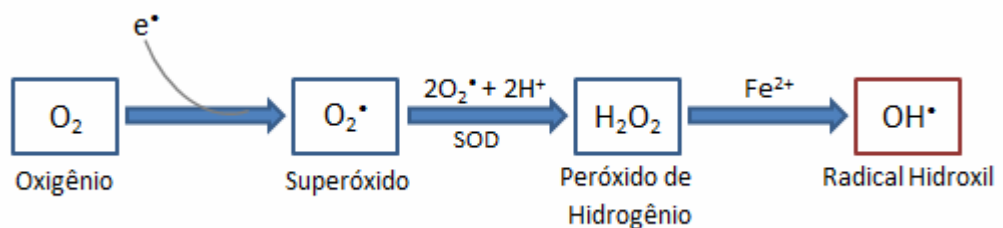
O radical superóxido é a primeira das espécies formada pela redução do oxigênio por um único elétron, sendo um bom exemplo de radical livre, pois contém um elétron desemparelhado. As taxas de reação do radical superóxido com lipídios, proteínas e DNA são lentas, por isso não possuem um significado biológico, porém um exemplo de formação de espécies altamente reativas a partir deste radical se dá pela sua reação com o Fe^{3+} livre, produzindo assim produtos que possuem alta capacidade de reagir com os ácidos graxos polinsaturados (PUFAs) e induzir a peroxidação lipídica (Hermes Lima, 2004). Existem vários mecanismos para a geração de radical superóxido em sistemas biológicos. Em grande parte, eles são produzidos como produtos colaterais do metabolismo de oxigênio. Do total de oxigênio consumido na cadeia respiratória, 95 a 98% são utilizados como aceptor final de elétrons pelas células animais, sendo totalmente reduzidos (por quatro elétrons) com a formação de água, por meio de etapas subsequentes de reduções parciais por um elétron, que ocorrem na cadeia respiratória. Entretanto, cerca de 2 a 5% do oxigênio é gerado como um intermediário reduzido por um elétron, formando o radical superóxido. Outras vias também estão relacionadas à geração deste radical como, via xantina oxidase, NADPH oxidase em células fagocíticas e sistema NADPH citocromo P-450 redutase.

A redução de um elétron do radical superóxido forma o peróxido de hidrogênio, por conversão espontânea e enzimática. O peróxido de hidrogênio não é considerado um radical livre, pois

não possui elétrons desemparelhados e é um agente oxidante relativamente fraco, no entanto seu potencial tóxico está relacionado à sua habilidade de atravessar membranas biológicas e sua alta estabilidade (Hermes Lima, 2004). As vias citadas anteriormente como geradoras do radical superóxido subsequentemente formam o peróxido de hidrogênio. Entretanto, o peroxissomo é um compartimento celular no qual há geração de grande quantidade de peróxido de hidrogênio, através da atuação de oxidases envolvidas no catabolismo de aminoácidos e na oxidação de ácidos graxos (Ribeiro et al., 2005).

Muitos dos efeitos oxidantes do peróxido de hidrogênio no DNA, lipídios e proteínas observados no passado, hoje são explicados diante da capacidade deste em reagir com metais de transição, como o Fe^{2+} , e produzir o radical hidroxil. Esta reação conhecida como reação de Fenton tem sido proposta como a principal via de geração do radical hidroxil, *in vivo*, onde a redução do peróxido de hidrogênio é catalisada por um metal. Porém outra via de geração destas espécies reativas de oxigênio se dá pelo o fato de que os íons de metais de transição também podem catalisar a reação entre peróxido de hidrogênio e o radical superóxido, pela chamada reação de Haber-Weiss, conduzindo à produção do radical hidroxil (Schneider e Oliveira, 2004). Uma vez presente no organismo, o radical hidroxil é uma das espécies mais reativas conhecidas e possui a capacidade de reagir com quase todos os tipos de moléculas do organismo. Esta espécie reativa de oxigênio está envolvida na iniciação da peroxidação lipídica nas membranas, assim como na oxidação e danos nas proteínas, DNA nuclear e mitocondrial (Hermes Lima, 2004).

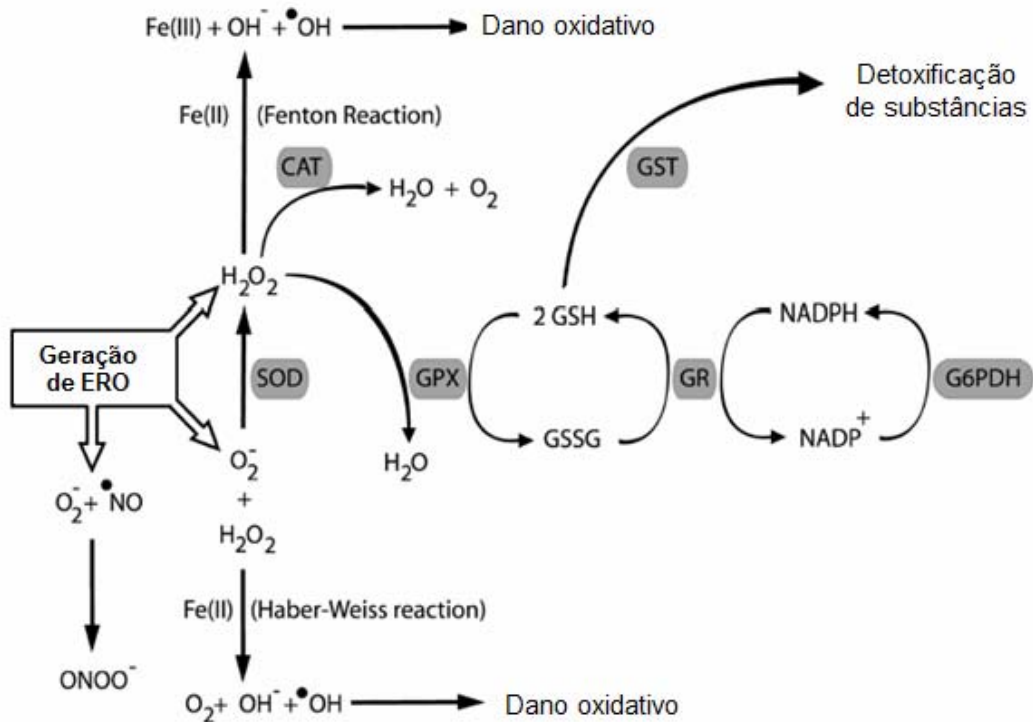
Figura 7 – Mecanismos de geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Adaptado de Mackenzie, 2008).



Uma vez que estas espécies reativas de oxigênio são continuamente formadas em organismos aeróbicos pelos processos normais do metabolismo, todas as células precisam neutralizar seus efeitos agressores, pois o acúmulo das ERO indica alto potencial de danos em todos os tipos de moléculas biológicas. Diante disto, todos os organismos aeróbicos dispõem de defesas antioxidantes, enzimáticas e não enzimáticas, para o combate das ERO. Dentre as defesas antioxidantes enzimáticas estão as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), a glutathiona peroxidase selênio-dependente (GPx). Estas enzimas são denominadas defesas antioxidantes primárias, pois reagem diretamente com as espécies reativas de oxigênio. A enzima glutathiona redutase (GR) participa de forma indireta na defesa antioxidante enzimática, atuando na reciclagem de substratos necessários para

a atividade das enzimas antioxidantes primárias e, portanto pertencem ao grupo das defesas auxiliares (Hermes Lima, 2004). A Figura 8 mostra que o sistema enzimático funciona de maneira conjunta para proteger as células das ERO.

Figura 8 – Esquema mostrando o trabalho conjunto das defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas no combate às ERO (Retirado de Hermes Lima, 2004).



Uma das principais enzimas antioxidantes é a SOD, responsável pela primeira linha de defesa da célula contra as ERO e que catalisa a conversão do radical superóxido através da dismutação em peróxido de hidrogênio e oxigênio. Pelo fato do radical superóxido resultar na formação de outras espécies altamente reativas, seu controle pela SOD constitui um importante mecanismo de defesa, confirmado por sua presença em todos os organismos aeróbicos (Halliwell e Gutteridge, 2005). Existem diferentes tipos de SOD que podem variar quanto a sua estrutura e localização. Existem duas formas de SOD que contêm cobre e zinco, a CuZn-SOD, uma delas corresponde à enzima presente principalmente no citoplasma das células, mas podem também estar presentes nos lisossomos, peroxissomos, núcleo e espaço intermembranoso das mitocôndrias de eucariontes e o outro tipo de CuZn-SOD corresponde à SOD extracelular, que está vinculada a superfície das células, especialmente nos pulmões e vasos sanguíneos. Um terceiro tipo de SOD é aquele que contém um íon de Mn^{3+} e está localizado na mitocôndria de uma variedade de organismos como as bactérias, leveduras, plantas e animais. A Mn-SOD desempenha papel central na regulação da concentração do radical superóxido intra-mitocôndrial e, portanto, atua na proteção da mitocôndria

contra o estresse oxidativo. Um quarto tipo de SOD é aquele que contém ferro, Fe-SOD, este tipo de enzima foi detectado em bactérias e cloroplasto de plantas superiores. No entanto, a Fe-SOD nunca foi observada nos animais (Hermes Lima, 2004). A vantagem da utilização da SOD como biomarcador é explicada pela tendência ao aumento de sua atividade na presença de xenobióticos e por essas alterações ocorrerem em poucas horas de exposição (Van der Oost et al., 2003; Valavanidis et al., 2006).

A dismutação do radical superóxido forma o peróxido de hidrogênio, que também precisa ser neutralizado. A enzima responsável pela sua decomposição é a CAT, que promove a quebra do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. A CAT é uma enzima que contém ferro e está localizada principalmente nos peroxissomos na maioria dos organismos, como os vertebrados, invertebrados, plantas, fungos e bactérias. Em vertebrados, a catalase é encontrada nos peroxissomos, principalmente de eritrócitos e fígado, e participa da metabolização dos ácidos graxo, sendo sua utilização como biomarcador de difícil interpretação (Van der Oost et al., 2003). Além da CAT, outra enzima é responsável pelo controle na concentração de peróxido de hidrogênio, a GPx, que emprega a GSH como co-substrato. A GPx se localiza no citosol e na matriz mitocondrial e divide com a CAT a habilidade de neutralizar o peróxido de hidrogênio (Martinez, 2006). É sabido que concentrações intracelulares elevadas de peróxido de hidrogênio são controladas pela enzima CAT, enquanto que pequenos aumentos deste peróxido parecem ser mais bem controlado pela GPx dependente de selênio (Hermes Lima, 2004).

Apesar de não participar diretamente da neutralização de ERO, a GR exerce papel fundamental na defesa antioxidante do organismo e é considerada uma enzima antioxidante auxiliar. A GR é responsável pela redução da glutatona oxidada (GSSG) pela GPx, através da oxidação do NADPH em NADP⁺, mantendo as concentrações adequadas de GSH em seu estado reduzido (Van der Oost et al., 2003; Hermes Lima, 2004).

Além das defesas antioxidantes enzimáticas os organismos aeróbicos ainda dispõem de moléculas endógenas que podem atuar como antioxidantes não enzimáticos e auxiliarem na defesa contra os radicais livres (Van der Oost et al., 2003). Entre elas, a GSH que é composta de glicina, cisteína e ácido glutâmico, que além de ser utilizado como co-fator da GST, pode atuar na defesa antioxidante como substrato da enzima GPx ou como primeira linha de defesa, se ligando diretamente a ERO. A GSH pode responder a contaminação ambiental, variando sua concentração, sendo assim, considerado um ótimo biomarcador para contaminação (Hermes Lima, 2004; Martinez, 2006).

2.7.3 Estresse Oxidativo

Como mencionado anteriormente, existe uma produção basal de ERO, as quais são neutralizadas e eliminadas. Isto significa que, em geral a quantidade de ERO produzida é teoricamente igual à eliminada. No entanto, devido algumas razões a concentração de ERO pode ser aumentada,

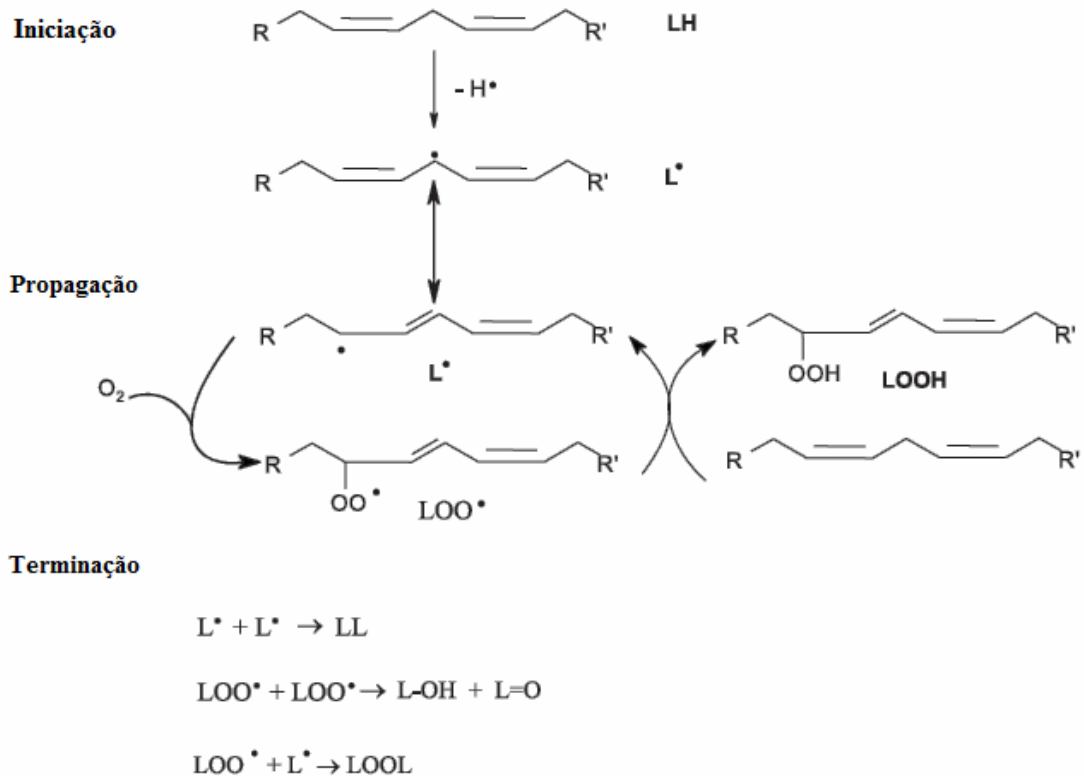
gerando perturbações no estado redox do organismo. Os xenobióticos podem agir sobre as diversas vias relacionadas à geração de ERO, levando ao aumento de sua produção dentro da célula (Lushchak, 2011). Quando há um desbalanço a favor dos pró-oxidantes e contra os antioxidantes ocorre o que chamamos de estresse oxidativo, o qual tem sido associado a vários processos celulares tóxicos, incluindo danos às proteínas, inativação de enzimas, peroxidação lipídica e quebras no DNA (Amado et al., 2009). Dentre as consequências relacionadas ao estresse oxidativo, a peroxidação lipídica e danos ao DNA, podem servir como ferramenta para a avaliação da toxicidade de um determinado poluente (Valavanidis et al., 2006).

2.7.4 Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica pode ser definida como um conjunto de reações em cadeia resultante da ação de espécies reativas sobre os PUFAs das membranas celulares. Este processo é dividido em três etapas: iniciação, propagação e terminação (Figura 9). O processo de iniciação acontece quando uma espécie oxidante suficientemente reativa retira um átomo de hidrogênio de um grupo metileno (-CH₂-) de um PUFA, formando um radical carbono centrado. Este radical é estabilizado por um rearranjo molecular para formar um dieno conjugado, ou seja, duas duplas ligações interligadas por uma ligação simples. Em meio aeróbico, o radical alquila (L[•]) inicialmente formado se combina com o oxigênio formando o radical peroxil (LOO[•]), o qual pode retirar um hidrogênio de outro ácido graxo, gerando outro radical carbono centrado e promovendo assim a etapa de propagação. O radical peroxil pode reagir com o átomo de hidrogênio retirado do ácido graxo e formar um hidroperóxido lipídico (LOOH). A etapa de terminação se dá pela aniquilação dos radicais formados originando produtos não radicalares. Os radicais peroxil e alcóxil também podem sofrer dismutação ou clivagem formando aldeídos, formar uma ligação covalente com resíduos de aminoácidos ou sofrer rearranjo formando produtos secundários da peroxidação lipídica (Lima e Abdalla, 2001; Hermes Lima, 2004).

O processo de peroxidação lipídica é considerado um dos maiores causadores de injúria e morte celular. A gravidade dos danos às membranas biológicas consequentes da peroxidação pode variar, dependendo da natureza e concentração do oxidante. As alterações nas membranas acarretam em transtornos da permeabilidade, inativação de receptores e enzimas de membrana, redução da fluidez da membrana e até mesmo o rompimento da integridade da bicamada (Lima e Abdalla, 2001; Hermes Lima, 2004). Diversos estudos já evidenciaram o aumento do nível peroxidação lipídica em diferentes órgãos de peixes expostos a uma variedade de contaminantes (Paulino et al., 2012; Simonato et al., 2011; Guilherme et al., 2010).

Figura 9 – Esquema das principais reações ocorridas durante o processo de peroxidação lipídica (Retirado de Lima e Abdalla, 2001).



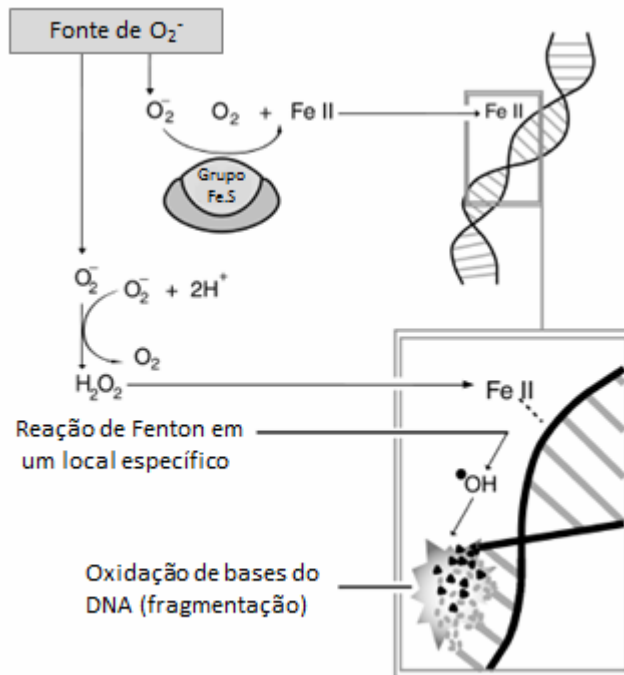
2.8 BIOMARCADORES GENOTÓXICOS

O grau de integridade do DNA em organismos expostos à contaminação é um biomarcador amplamente utilizado para a avaliação dos efeitos tóxicos dos poluentes ambientais. Os xenobióticos presentes no ambiente podem ser classificados como genotóxicos quando possuem a capacidade de interagir com partes da molécula do DNA, tais como as bases, desoxirribose e ácido fosfórico e consequentemente promover alterações em sua estrutura (Zhu et al., 2005). Estas alterações podem ser resultantes de uma interação direta do xenobiótico na molécula de DNA, como por seus metabólitos originados no processo de biotransformação ou ainda pelas ERO geradas em decorrência de sua presença. Em consequência das alterações, os danos observados no DNA incluem quebras de fita, modificações nos nucleotídeos, formação de aduto, mutações de ponto e aberrações cromossômicas (Frenzilli et al., 2004; Zhu et al., 2005).

Danos oxidativos no DNA são reconhecidos como a principal causa de morte celular e mutações em organismos aeróbicos. O radical superóxido e o peróxido de hidrogênio não atuam diretamente nestes danos, no entanto eles podem interagir com metais de transição e formarem o radical hidroxil pela reação de Fenton (Figura 10) (Bjelland e Seeberg, 2003). Das espécies reativas de oxigênio, o radical hidroxil é o mais reativo com a molécula de DNA, reagindo na adição de ligações duplas nas bases nitrogenadas e remoção de um átomo de hidrogênio, tanto do grupo metil da

base timina quanto de cada uma das ligações C-H da pentose desoxirribose (Cooke et al., 2003; Barreiros e David, 2006).

Figura 10 – O papel do ferro no dano oxidativos do DNA. Radicais superóxidos formados a partir de fontes celulares (tais como mitocôndria e retículo endoplasmático) sofrem dismutação para H₂O₂ e também causam liberação de Fe (II) a partir de proteínas que contém Fe-S. Quando o Fe (II) se liga ao DNA reage com o H₂O₂ e produz reação de Fenton sítio-específica e formação de •OH, levando ao dano oxidativos no DNA (Retirado de Hermes Lima, 2004).



A avaliação do impacto de agentes potencialmente genotóxicos aos organismos pode ser realizada por uma variedade de metodologias. A detecção de quebras no material genético tem sido uma ótima ferramenta no monitoramento dos efeitos subletais de poluentes em animais aquáticos, uma vez que existem testes, como por exemplo, o ensaio do cometa, que são sensíveis a esse tipo de dano (Ohe et al., 2004; Cavalcante et al., 2008). O ensaio do cometa é um método que vem sendo amplamente utilizado para avaliação de quebras na fita de DNA, porém é importante ressaltar que esses danos são passíveis de reparo. Trata-se de um método rápido, possuir uma boa reprodutibilidade e necessitar de um número pequeno de células (Castro, 2004). A técnica se baseia na detecção de fragmentos de DNA que migram mais rapidamente durante a eletroforese do que o DNA intacto, formando uma cauda. Na versão alcalina, pode ser visualizado além de quebras de fita dupla no DNA, as quebras de fita simples e sítios alcalilabeis (Tice et al., 2000). A adição de enzimas de restrição pode ser utilizada para aumentar a sensibilidade do teste, uma vez que estas enzimas são capazes de reconhecerem a oxidação de bases específicas por ERO e indicam quebras adicionais para a detecção de danos de origem oxidativa. As endonucleases específicas, frequentemente utilizadas são

a DNA-formamidopirimidina glicosilase (FPG), que reconhece oxidação de bases púricas e a endonuclease III (Endo III), que reconhece oxidação de bases pirimídicas.

2.9 BIOMARCADORES FISIOLÓGICOS

Atualmente, os biomarcadores fisiológicos são utilizados extensivamente para documentar e quantificar tanto a exposição quanto os efeitos de poluentes ambientais, tais como os metais (Tellis et al., 2012; Nascimento et al., 2012), herbicidas (Nascimento et al., 2012; Koakoski et al., 2013) e outros compostos orgânicos (Simonato et al., 2008; Cannas et al., 2012). A grande vantagem na utilização de parâmetros fisiológicos como biomarcadores, é que estes podem integrar efeitos de múltiplos estressores e auxiliar na elucidação dos mecanismos de ação destes (Adams, 1990). Neste contexto, a utilização de alguns parâmetros fisiológicos pode ser uma ferramenta bastante útil para a avaliação dos efeitos de contaminantes nas populações de peixes (Winkaler et al., 2001). Dentre uma ampla variedade podem ser citados alguns parâmetros tais como: hematológicos, osmorregulatórios, endócrinos e metabólicos, que podem variar em decorrência de um efeito direto do xenobiótico.

2.9.1 Parâmetros Hematológicos

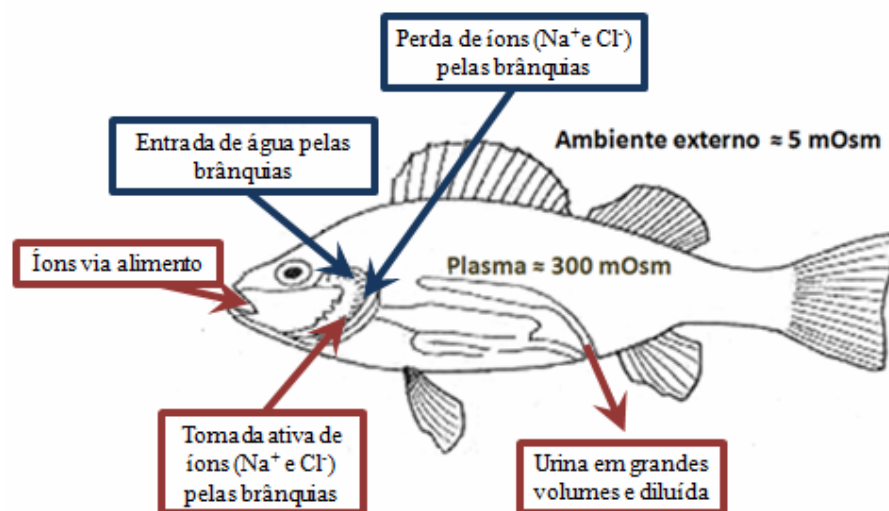
Os parâmetros hematológicos, tais como: hematócrito (porcentagem de células vermelhas no volume total de sangue), concentração de hemoglobina e número de eritrócitos (RBC) são considerados não específicos na sua resposta em relação a estressores químicos (Van der Oost et al., 2003). No entanto, estes parâmetros podem fornecer informações importantes na avaliação do estado estrutural e funcional de peixes expostos a agentes tóxicos, como por exemplo, os poluentes ambientais (Adhikari et al., 2004). Xenobióticos podem afetar a produção, função e até mesmo a sobrevivência dos eritrócitos de peixes (Bloom e Brandt, 2008), refletindo no aumento ou decréscimo dos parâmetros hematológicos (Martinez e Cólus, 2002). É ampla a utilização destes parâmetros na avaliação de toxicidade de compostos químicos (Affonso et al., 2002; Adhikari et al., 2004; Ribeiro et al., 2006), e embora estes parâmetros sejam cada vez mais utilizados em programas de monitoramento ambiental como bons indicadores nas alterações fisiológicas sob a presença de substâncias tóxicas, a principal barreira na utilização destes parâmetros é a falta de informações básicas sobre as respostas hematológicas a agentes estressores em peixes tropicais (Affonso et al., 2002).

2.9.2 Parâmetros Osmorregulatórios

Os peixes são considerados bons osmorreguladores devido à capacidade de manter a concentração osmótica e iônica dos seus fluídos corporais independentes do meio externo. Para os

teleósteos de água doce, a principal adversidade no que se diz respeito à osmorregulação, é o fato destes organismos se apresentarem hiperosmóticos em relação ao meio (Evans, 2008). Dessa forma, a água tende a entrar no peixe e promover a diluição do meio interno. Do mesmo modo, nas brânquias os íons tendem a sair por difusão. A fim de manter seu equilíbrio osmótico e iônico, o peixe dulcícola realiza a hiperregulação. Neste processo, o peixe realiza a captação iônica de forma ativa, a qual é realizada principalmente pelas brânquias e elimina o excesso de água pelo o rim, através da produção de uma urina diluída e em grande volume (Figura 11) (Evans et al., 2005).

Figura 11 – Esquema resumido da hiperregulação em teleósteos dulcícolas. As caixas de texto azuis representam transporte passivo; as vermelhas, transporte ativo (Adaptado de Evans, 2008).



Para a tomada ativa de íons, os peixes possuem no epitélio branquial um tipo especial de células, denominadas células cloreto. Estas células possuem uma série de vias para o transporte iônico, entre elas canais, trocadores e ATPases. O elevado potencial metabólico destas células é devido ao grande número de mitocôndrias e conseqüentemente sua capacidade de suprir a demanda energética das ATPases no transporte de íons (Marshall e Bryson, 1998). Dentre as ATPases presentes nas células cloreto a mais abundante é a Na^+/K^+ -ATPase (NKA), que está presente na membrana basolateral das células cloreto e tem grande importância na tomada de íons, uma vez que está relacionada diretamente à manutenção intracelular dos íons sódio e potássio e indiretamente na geração de potencial eletroquímico para a absorção de sódio e cloreto (Gonzalez et al., 2006; Ligwood et al., 2006).

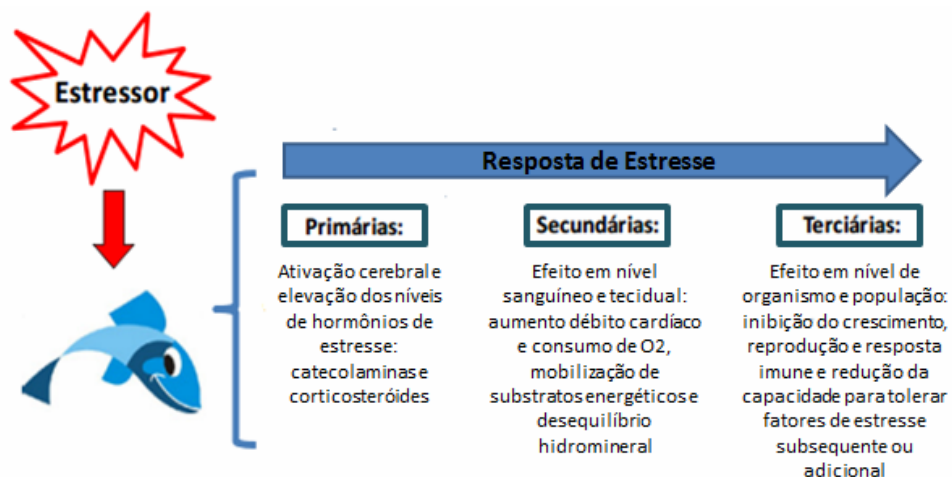
Dados da literatura apontam a capacidade que alguns contaminantes possuem em interferirem na atividade da NKA (Assis et al., 2009; Nascimento et al., 2012; Simonato et al., 2011), e promoverem alterações no processo de osmorregulação e nas concentrações iônicas dos organismos

aquáticos (Paulino et al., 2012). Desta forma, a avaliação da atividade da NKA assim como as medidas de osmolaridade e concentrações dos íons Na^+ , Cl^- e K^+ podem ser parâmetros indicativos de alterações no processo de hiperregulação em peixes de água doce, quando em contato com contaminantes (Heath, 1995).

2.9.3 Resposta de Estresse e Cortisol

Estresse é uma condição na qual o equilíbrio fisiológico dinâmico, ou homeostase, de um determinado organismo é perturbado ou influenciado por um estímulo intrínseco ou extrínseco denominado agente estressor (Barton e Iwama, 1991). Os peixes frente a um agente estressor possuem a capacidade de responder fisiologicamente, em razão disto, desde a década de 1970 estudos envolvendo a resposta de estresse em peixes tem sido frequentemente empregados na fisiologia (Silveira et al., 2009), e atualmente, existe uma extensa literatura sobre as bases fisiológicas e endócrinas de estresse em peixes (Pankhurst, 2010). A resposta de estresse pode ser vista como a capacidade dos peixes mobilizarem reservas energéticas de forma a evitar ou vencer imediatamente a situação de ameaça. Segundo Barton (2002), os agentes estressores em peixes podem ser de inúmeros tipos, dentre eles podemos citar aqueles de natureza química, tais como os contaminantes e os de natureza física como, por exemplo, o manuseio. Assim, diante do agente estressor, o peixe necessita de uma resposta imediata a qual pode ser de curto ou longo prazo, sendo caracterizada por três fases: primária, secundária e terciária (Figura 12).

Figura 12 – Representação esquemática dos níveis de resposta ao estresse



A resposta primária envolve mudanças neuroendócrinas, as quais são desencadeadas imediatamente após a exposição ao agente estressor. A ativação de centros cerebrais resulta na liberação de catecolaminas e corticosteroides. A liberação de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) é uma resposta desencadeada pelo estímulo no eixo hipotálamo-simpático-cromafins (HSC) em que os estímulos são levados dos órgãos sensoriais para o hipotálamo, que por sua vez

estimula à liberação de catecolaminas pelas células cromafins, as quais ocorrem dispersas ou em pequenos grupos no rim cefálico e atuam em situações que exijam aumento na capacidade de transporte de oxigênio e na mobilização de substratos energéticos (Wendelaar Bonga, 1997). A estimulação do eixo hipotálamo-hipófise-interrenal (HPI) resulta na liberação de cortisol na circulação (Barton, 2002), o qual está relacionado com a regulação do equilíbrio hidromineral e metabolismo energético, redução na taxa de crescimento, supressão da função reprodutiva e do sistema imune. A liberação destes hormônios acarretará em ações e efeitos imediatos em nível sanguíneo e tecidual, os quais são caracterizados como resposta secundária. Níveis elevados de glicose, os quais são relatados em muitas espécies de peixes, é uma das respostas secundárias mais utilizadas para a quantificação de estresse nestes organismos (Barton e Iwama, 1991; Wendelaar Bonga, 1997). Esta resposta está tanto relacionada ao aumento das catecolaminas circulantes, devido ao papel exercido por este hormônio na degradação do glicogênio hepático, quanto ao aumento de cortisol, o qual favorece a mobilização de glicose a partir da glicogenólise e gliconeogênese (Mommsen et al., 1999). Este efeito hiperglicemiante como resposta de estresse ocorre como um meio para fornecer energia extra ao animal, para que este possa transpor o distúrbio imposto (Barton e Iwama, 1991; Wendelaar Bonga, 1997). Outros distúrbios causados pelo estresse em peixes, os quais também qualificam as respostas secundárias são as alterações hematológicas e as osmorregulatórias (McDonald e Milligan, 1997). A resposta terciária estende-se em nível do organismo e população com a inibição do crescimento, reprodução e resposta imune e redução da capacidade para responder a fatores de estresse subsequentes ou adicionais (Wendelaar Bonga, 1997).

O cortisol é o principal corticosteróide em peixes teleósteos e sua síntese ocorre no tecido interrenal, situado na região do rim cefálico (Mommsen et al., 1999). A secreção deste hormônio é controlada pelo eixo hipotálamo-hipófise-interrenal – eixo HHP, sendo iniciada no núcleo paraventricular hipotalâmico com a liberação do hormônio liberador da corticotropina, CRH (Wendelaar Bonga, 1997; Barton, 2002). Uma vez liberado, o CRH estimula na hipófise a secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). A hipófise parece ser o controle endócrino dominante da secreção de cortisol, sendo o ACTH o secretagogo mais potente. O ACTH circulante, por fim, estimula as células interrenais no rim cefálico a sintetizar e liberar os corticosteroides para distribuição nos tecidos (Wendelaar Bonga, 1997; Barton, 2002). Nas células interrenais, o cortisol é sintetizado a partir do colesterol pela clivagem da cadeia lateral mediada pela atividade enzimática de citocromos do complexo P450, localizados no interior da membrana mitocondrial.

O controle da síntese do cortisol ocorre por retroalimentação negativa, o qual níveis elevados de cortisol atuam no hipotálamo e na hipófise, modulam a produção de ACTH e, conseqüentemente, a liberação do cortisol (Mommsen et al., 1999). A elevação plasmática do cortisol é o indicador de estresse mais amplamente utilizado em peixes expostos a uma variedade de classes de contaminantes, tais como: herbicidas (Langiano e Martinez, 2008; Cericato et al., 2008; Nascimento et al., 2012), metais (Camargo et al., 2009; Nascimento et al., 2012) e outros compostos orgânicos

(Simonato et al., 2008). No entanto, vale ressaltar que, embora grande parte dos estudos considere os níveis plasmáticos de cortisol como indicador de estresse, a simples secreção do hormônio não significa um aumento em seus efeitos, sua forma livre é biologicamente ativa, porém grande parte do cortisol no sangue circula ligado a proteínas transportadoras (Mommsen et al., 1999). O cortisol nos teleósteos está diretamente relacionado com o metabolismo energético e o controle hidromineral existente nos peixes, sendo as brânquias, o intestino e o fígado importantes alvos deste hormônio (Wendelaar Bonga, 1997). Nas brânquias o cortisol atua na diferenciação de células cloreto e a atividade da Na^+/K^+ - ATPase. No fígado, promove o aumento da glicogenólise como também pode agir aumentando a atividade de enzimas chave da gliconeogênese, com liberação de glicose na corrente sanguínea. No músculo, promove a proteólise, com liberação de aminoácidos para servirem de substrato na gliconeogênese, e o aumento de lactato no sangue é resultado da respiração anaeróbica. No tecido adiposo, promove lipólise com liberação de ácidos graxos livres que podem ser fonte de energia, e glicerol, substrato para a gliconeogênese. (Figura 13). Portanto, este hormônio exerce papel essencial na disponibilização de substratos, principalmente glicose, para lidar com a situação de estresse (Mommsen et al., 1999).

O cortisol pode também interagir com diversos hormônios, o que torna ainda mais ampla a lista de alvos de regulação. Além disso, a resposta do animal ao hormônio pode ser afetada por fatores que regulam sua disponibilidade, tais como proteínas de ligação, receptores nos tecidos alvo, captação pelos tecidos e catabolismo do hormônio. Fatores externos, tais como: salinidade do ambiente, maturidade e estado nutricional podem também influenciar a produção e secreção de cortisol. (Mommsen et al., 1999).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar os efeitos do surfactante polioxietileno amina (POEA) no teleósteo neotropical *Prochilodus lineatus* por meio da análise integrada de um conjunto de biomarcadores bioquímicos, genotóxicos e fisiológicos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar os efeitos da exposição ao POEA na atividade de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos no fígado de *P. lineatus*;
- Verificar se a exposição ao POEA promove danos oxidativos no fígado e danos no DNA de eritrócitos de *P. lineatus*;
- Avaliar os efeitos da exposição ao POEA em parâmetros hematológicos, osmorregulatórios e na glicemia e cortisol plasmáticos de *P. lineatus*
- Verificar se o POEA interfere na resposta de estresse deflagrada pela exposição aérea.

4 EFEITOS DO SURFACTANTE POLIOXIETILENO AMINA (POEA) EM PARÂMETROS BIOQUÍMICOS, GENÉTICOS E FISIOLÓGICOS DO TELEÓSTEO *PROCHILODUS LINEATUS*

Neste capítulo estão descritos os experimentos e resultados referentes à avaliação dos efeitos de três concentrações (0,15, 0,75 e 1,5 mg.L⁻¹) do surfactante polioxietileno amina (POEA) em parâmetros bioquímicos (enzimas de biotransformação fase I e fase II, defesa antioxidante enzimática e não enzimática, peroxidação lipídica), genotóxicos (danos no DNA de eritrócitos) e fisiológicos (RBC, hematócrito e hemoglobina, concentrações plasmáticas de cortisol, glicose, Na⁺ Cl e atividade branquial da enzima Na⁺/K⁺ - ATPase) para a espécie de peixe nativa *Prochilodus lineatus*.

4.1 MATERIAL E MÉTODOS

4.1.1 Animais

Juvenis de *P. lineatus* com massa corpórea de 12,48 ± 3,23 g (média ± DP, n = 102) foram fornecidos pela Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina (EPUEL). Os peixes foram aclimatados durante 7 dias, em tanques de 300 L, com água desclorada e aeração constante. Os parâmetros físicos e químicos da água foram monitorados usando uma sonda para multiparâmetros (Horiba U-50) e mantiveram-se em condições adequadas para a realização dos experimentos (média ± EP): temperatura 21,4 ± 1,7 °C; pH 6,9 ± 1,2; oxigênio dissolvido 7,1 ± 0,6 mg.L⁻¹; condutividade 91,5 ± 2,9 µS cm⁻¹ e o fotoperíodo ajustado para 12h/12h. Os animais foram alimentados no segundo, quarto e sexto dia de aclimação e a alimentação foi suspensa 24 h antes e durante a realização dos experimentos.

4.1.2 Delineamento Experimental e Amostragem

Após a aclimação, os animais foram submetidos a testes de toxicidade aguda, do tipo estático, durante 24 h, em aquários de vidro de 100 L contendo 80 L de água. Para realização dos testes, foram formados quatro grupos, com oito animais em cada: um grupo controle (CTR), com peixes expostos somente a água desclorada e três grupos experimentais, expostos a diferentes concentrações de POEA (CAS: 24991-53-5, Sigma-Aldrich P9906): 0,15 mg.L⁻¹ (POEA 1), 0,75 mg.L⁻¹ (POEA 2) e 1,5 mg.L⁻¹ de POEA (POEA 3). Estas concentrações foram definidas considerando-se: (i) concentrações ambientalmente realistas, uma vez que já foi encontrada uma concentração máxima de 9 mg.L⁻¹ de Roundup[®] em corpos d'água (Giesy et al., 2000), que corresponde a 1,35 mg.L⁻¹ de POEA; (ii) testes já realizados em nosso laboratório com a espécie *P. lineatus* exposta a 1 e

5 mg.L⁻¹ de Roundup Transorb[®] (Modesto e Martinez, 2010a) e 10 mg.L⁻¹ de Roundup[®] (Modesto e Martinez, 2010b) que corresponde respectivamente a 0,15 mg.L⁻¹, 0,75 mg.L⁻¹ e 1,5 mg.L⁻¹ de POEA.

Após o tempo de exposição, os peixes foram anestesiados em benzocaína (0,12 g.L⁻¹) e, com auxílio de seringas heparinizadas, foi retirado o sangue pela veia caudal. Após a coleta de sangue, os animais foram mortos por secção medular para a retirada do fígado e brânquias. Estes procedimentos estão de acordo com os protocolos aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (Processo 35004.2011.18). Os filamentos das brânquias foram separados dos arcos branquiais e armazenados em tampão SEI (300 mM de sacarose, 0,1 mM de EDTA e 30 mM de Imidazol) em freezer (-20°C) e o fígado foi armazenado em tubos plásticos de 1,5 mL em ultrafreezer (-80°C).

4.1.3 Parâmetros Fisiológicos

A partir do sangue coletado, uma alíquota foi imediatamente utilizada para a determinação do hematócrito, por microcentrifugação (1.200 g; 5 min) em tubos capilares, e o conteúdo de hemoglobina foi estimado pelo método colorimétrico com cianeto de metahemoglobina utilizando-se kit comercial (Labtest Diagnóstica, Brasil), em espectrofotômetro (Libra S32, Biochrom, Reino Unido) a 540 nm. O número de eritrócitos por mm³ de sangue (RBC) foi determinado em amostras de sangue fixadas em tampão formol citrato utilizando-se câmara de Neubauer.

O sangue foi centrifugado (10 min, 1870 g) e o plasma separado e armazenado em freezer (-20°C). O cortisol plasmático foi mensurado por imunoensaio com a utilização de kit comercial (Monobind Inc., USA) em leitora de microplacas (ELX 800, BioTek, USA), em 450 nm. A glicose plasmática foi analisada pelo método da glicose oxidase, usando kit comercial (Labtest Diagnóstica, Brasil) em espectrofluorímetro de microplacas (Victor 3, Perkin Elmer, USA), em 505 nm. A concentração de lactato no plasma foi determinada utilizando kit enzimático comercial (Labtest Diagnóstica, Brasil), em espectrofotômetro (Libra S32, Biochrom, Reino Unido) a 550 nm.

A osmolalidade plasmática foi determinada por congelamento utilizando um osmômetro (Osmomat 030, Gonotec, Alemanha). A concentração plasmática de cloreto foi avaliada pelo método do tiocianato de mercúrio com auxílio do kit comercial (Labtest Diagnóstica, Brasil), em espectrofotômetro de microplacas a 470 nm. O plasma foi diluído em água destilada (1:100) para a determinação da concentração de sódio, em fotômetro de chama (900, Analyser, Brasil).

Para a determinação da atividade da enzima Na⁺/K⁺-ATPase (NKA), os filamentos branquiais de cada animal foram homogeneizados em tampão SEI (1:10 p/v) e centrifugados (15 min; 7500 g; 4°C). O sobrenadante foi utilizado para medir a atividade da NKA de modo indireto, através da produção de fosfato inorgânico proveniente da quebra de ATP, em amostras incubadas com KCl e com ouabaína (Quabius et al., 1997). E como padrão foi utilizada solução de fósforo de 650 µM (Sigma). Os ensaios foram realizados em leitora de microplacas (ELX 800, BioTek, USA) a 620 nm.

A concentração de proteína no homogeneizado branquial foi quantificada pelo método de Lowry et al. (1951), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

4.1.4 Parâmetros Bioquímicos

As amostras de fígado foram pesadas e homogeneizadas (1:10 p/v) em tampão fosfato (0,1 M; pH 7,0), centrifugadas (20 min; 13000 g; 4°C) e o sobrenadante separado para as análises dos parâmetros bioquímicos.

4.1.4.1 *Enzimas de biotransformação*

A indução da CYP1A foi determinada pela análise da atividade da etoxiresorufina-O-desetilase (EROD). O método adaptado de Eggens et al. (1992) consiste na medida do aumento progressivo da fluorescência, resultante da conversão da 7-etoxiresorufina (ETOX) para resorufina, a cada minuto, durante 10 minutos (ex: 530nm e em: 590 nm) em espectrofluorímetro de microplacas. A mistura de reação continha tampão de potássio 0,1 M; pH 7,6; NADPH 2mM e 0,1 mM 7-etoxiresorufina e a reação foi iniciada pela adição da amostra na mistura de reação. A porção inicial linear da curva foi utilizada para avaliar a taxa de reação e a atividade da EROD foi expressa em pmol de resorufina.min⁻¹.mg de proteína⁻¹, baseada em uma curva padrão de resorufina. A atividade GST foi determinada seguindo a complexação da glutathiona reduzida (GSH) com o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), em espectrofotômetro a 340 nm (Keen et al.,1976). A atividade da enzima foi expressa em nmol CDNB conjugado.min⁻¹.mg de proteína⁻¹.

4.1.4.2 *Enzimas antioxidantes*

A atividade da SOD foi determinada pela medida da inibição da taxa de redução do citocromo c pelo radical superóxido em espectrofotômetro, a 550 nm, de acordo com McCord e Fridovich (1969). A atividade da enzima foi expressa em U de SOD.mg de proteína⁻¹, sendo que U representa a quantidade de SOD que promove a inibição de 50% da taxa de redução do citocromo c. A atividade da CAT foi determinada através da velocidade da decomposição de H₂O₂ pela enzima, onde foi avaliado o decréscimo de absorvância em espectrofotômetro, a 240 nm (Beutler, 1975). A atividade da enzima foi expressa em μmol de H₂O₂.min⁻¹.mg de proteína⁻¹. A atividade da GPx foi estimada através da oxidação do NADPH em presença de H₂O₂, em espectrofotômetro a 340 nm e expressa em μmol de NADPH oxidado.min⁻¹.mg de proteína⁻¹(Hopkins e Tudhope, 1973). A atividade da GR foi determinada indiretamente pela redução do NADPH mediante a presença da glutathiona oxidada (Carlbert e Mannervik, 1975), em espectrofotômetro a 340 nm. A atividade da enzima foi expressa em μmol NADPH oxidado.min⁻¹.mg de proteína⁻¹.

4.1.4.3 *Antioxidante não enzimático*

A concentração de GSH no fígado foi estimada de acordo com Beutler e colaboradores (1963) através da reação da glutatona com o substrato 5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico (DTNB), formando o tiolato (TNB), que foi quantificado em espectrofluorímetro de microplacas, em 412 nm e expressa em μg de GSH.mg de proteína⁻¹.

4.1.4.4 *Peroxidação lipídica*

A peroxidação lipídica foi determinada por meio de dois ensaios: i) ensaio FOX (ferro xilenol laranja), a partir da oxidação do Fe²⁺ na presença de xilenol laranja e ii) ensaio TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), a partir da produção de malondialdeído (MDA). O ensaio FOX foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Jiang et al. (1991), que emprega o butil-hidroxitolueno na mistura de reação, e as leituras de absorbância foram feitas em espectrofotômetro, em 560 nm. Os níveis de peroxidação lipídica foram expressos em μmol hidroperóxido de cumeno.mg de proteína⁻¹, a partir de uma curva padrão para o hidroperóxido de cumeno (CHP). O ensaio TBARS foi realizado pela medida do malondialdeído (MDA), um dos produtos finais de peroxidação lipídica, o qual foi quantificado em espectrofluorímetro de microplacas, em 530 nm, seguindo a metodologia descrita por Satoh (1978). Neste caso, a lipoperoxidação foi expressa μmol MDA.mg de proteína⁻¹, utilizando uma curva padrão MDA. A determinação da peroxidação lipídica por metodologias distintas teve como objetivo avaliar a lipoperoxidação em fases distintas, onde FOX mede hidroperóxidos que são produtos primários e TBARS mede o malondialdeído, um dos produtos finais.

4.1.5 *Análises Genéticas - Ensaio do Cometa*

Alíquotas de sangue recém coletadas foram misturadas ao soro bovino fetal (10:700) e preservadas por 24 h em soro bovino fetal (SBF) para a realização do ensaio do cometa (Ramsdorf et al., 2009). A metodologia empregada no ensaio do cometa alcalino (pH > 13) foi baseada no protocolo de Singh et al. (1988), com algumas modificações. Os passos básicos do Ensaio do Cometa com enzimas foram executados da seguinte forma, para cada animal foi adicionada uma alíquota da mistura (sangue/SBF) à agarose de baixo ponto de fusão (0,5%), o homogeneizado foi dividido em seis lâminas, cobertas com duas camadas de agarose de ponto de fusão normal (1,5%) e depois com lamínulas. Após a solidificação da agarose, as lamínulas foram retiradas e as lâminas submetidas à solução de lise gelada e recém preparada (2,5M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 10, Triton X-100 a 1% e DMSO a 10%) a 4°C por uma hora. Após essa etapa foi utilizada a técnica com as enzimas endonuclease III (endo III) e formamidopirimidina-DNA glicosilase (FPG) para

detecção, respectivamente, de pirimidinas e purinas oxidadas, avaliando assim possíveis danos oxidativos no DNA. Para tanto, após a lise as lâminas foram lavadas em PBS e colocadas em tampão Flare (Hepes 40 mM, KCl 0,1 M, albumina de soro bovino 0,2 mg.mL⁻¹ e EDTA 0,5 mM, pH 8) durante 15 min.

Para cada animal foram confeccionados 3 pares de lâminas de maneira distinta: ao 1º par foi adicionado somente o tampão Flare (Controle); ao 2º par foi adicionado o tampão Flare com a enzima endo III (1:100) e ao 3º par foi adicionado o tampão Flare com a enzima FPG (1:100). Todas as lâminas foram cobertas com lamínula e incubadas a 37°C por 45 min. Após a solidificação da agarose, as lâminas foram transferidas para cuba de eletroforese com tampão alcalino (1 Mm EDTA e 300 mM NaOH, pH > 13) por 30 min para a desespiralização do DNA e exposição dos sítios alcalilábeis. Em seguida a eletroforese foi conduzida a 25 V e 300 mA por 20 min. Finalizada a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas (0,4 M de Tris, pH 7,5) por 15 min, fixadas em etanol absoluto e secas a temperatura ambiente. Para análise, as lâminas foram coradas com Gel Red e analisadas em microscópio de fluorescência. Foram analisados 100 nucleóides por lâmina. Baseado em Kobayashi et al. (1995), os danos no DNA foram classificados visualmente conforme a migração dos fragmentos de DNA em quatro classes: 0: sem dano visível; 1: cauda menor que o diâmetro do núcleo; 2: comprimento de cauda de 1 a 2 vezes o diâmetro do núcleo; 3: comprimento da cauda maior que duas vezes o diâmetro do núcleo. Para cada peixe o escore foi calculado multiplicando-se o número dos nucleóides observados em cada classe de dano pelo valor da classe (0, 1, 2 e 3), gerando um valor entre 0 e 300. Foram feitos dois tipos de análises, o primeiro com o objetivo de determinar danos inespecíficos na molécula de DNA, comparando-se o escore calculado a partir das lâminas que foram expostas apenas tampão Flare, para cada grupo experimental (CTR x POEA 1 x POEA 2 x POEA 3). A segunda análise teve como objetivo a quantificação de danos oxidativos. Foi realizada a comparação estatística entre os escores médios encontrados nas lâminas de um mesmo grupo (CTR x POEA 1 x POEA 2 x POEA 3) da seguinte forma: escore médio das lâminas expostas ao tampão Flare x escore médio das lâminas expostas a Endo III e escore médio das lâminas expostas ao tampão Flare x escore médio das lâminas expostas a FPG.

4.1.6 Análises Estatísticas

Após verificação da normalidade e homogeneidade de variância, os resultados dos diferentes parâmetros obtidos para os peixes do grupo controle (CTR) e dos grupos POEA 1, POEA 2 e POEA 3 foram comparados entre si por meio de análise de variância paramétrica (ANOVA) e as diferenças foram localizadas pelo teste de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls (SNK). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

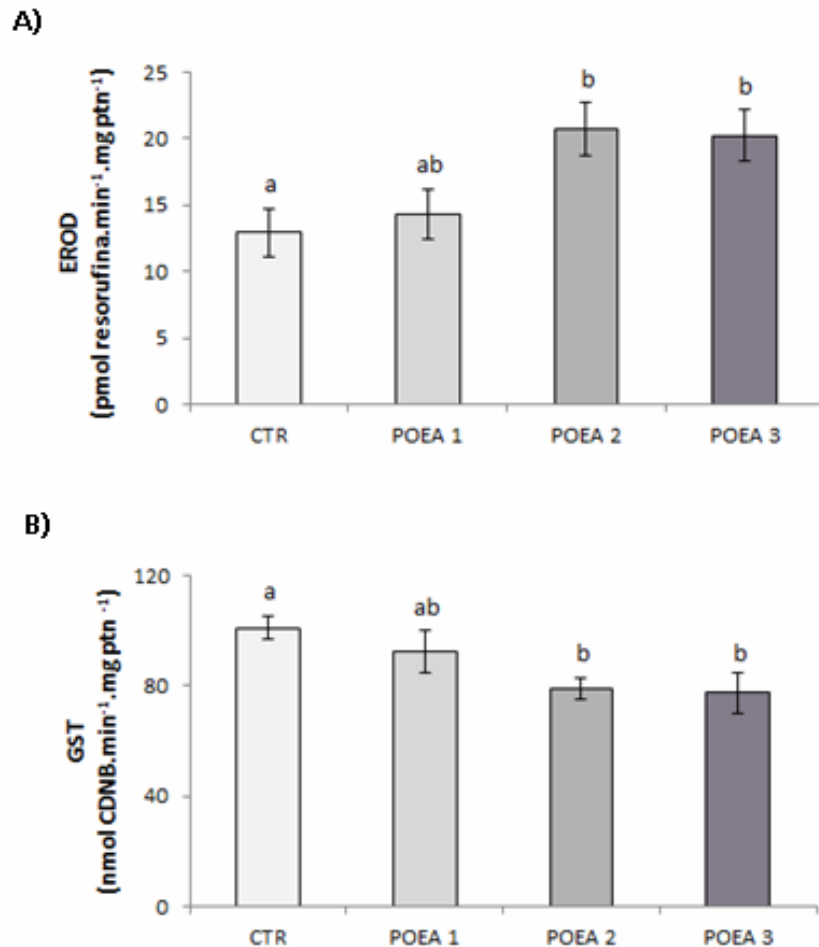
4.2 RESULTADOS

Durante os testes, não houve mortalidade em nenhum grupo experimental e os parâmetros da água foram monitorados: temperatura $21,4 \pm 1,7$ °C; oxigênio dissolvido $8,43 \pm 1,2$ mg.L⁻¹; pH $7,2 \pm 2,6$ e condutividade $112 \pm 5,6$ μS cm⁻¹.

4.2.1 Parâmetros Bioquímicos

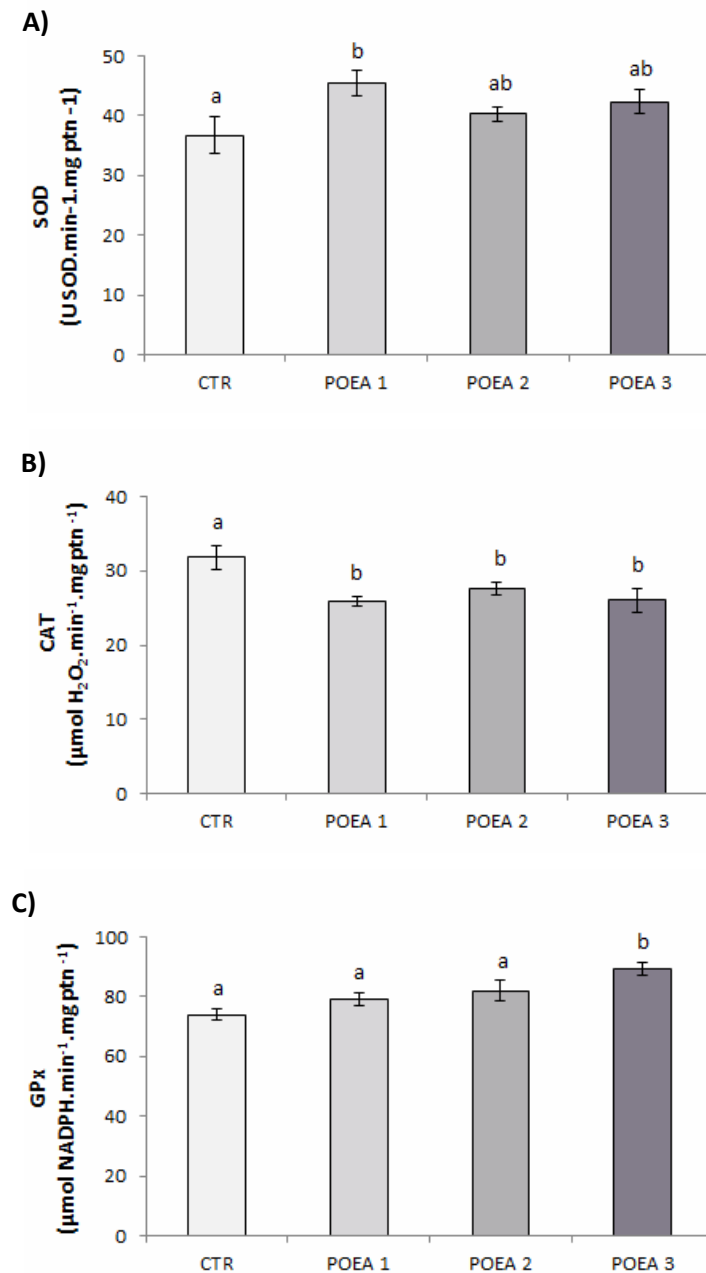
Os peixes dos grupos POEA 2 e POEA 3 apresentaram aumento significativo da EROD ($p = 0,044$) quando comparados aos animais do grupo controle (Figura 14A). Já a atividade da GST foi significativamente reduzida ($p = 0,021$) nos peixes dos grupos POEA 2 e POEA 3 em comparação aos animais do grupo controle (Figura 14B).

Figura 14 – Atividade hepática (média ± EP, N=7-10) da EROD (A) e GST (B) em *Prochilodus lineatus* expostos por 24 h apenas à água (CTR) ou a 0,15 mg.L⁻¹ (POEA 1); 0,75 mg.L⁻¹ (POEA 2); 1,5 mg.L⁻¹ (POEA 3) do surfactante POEA. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).



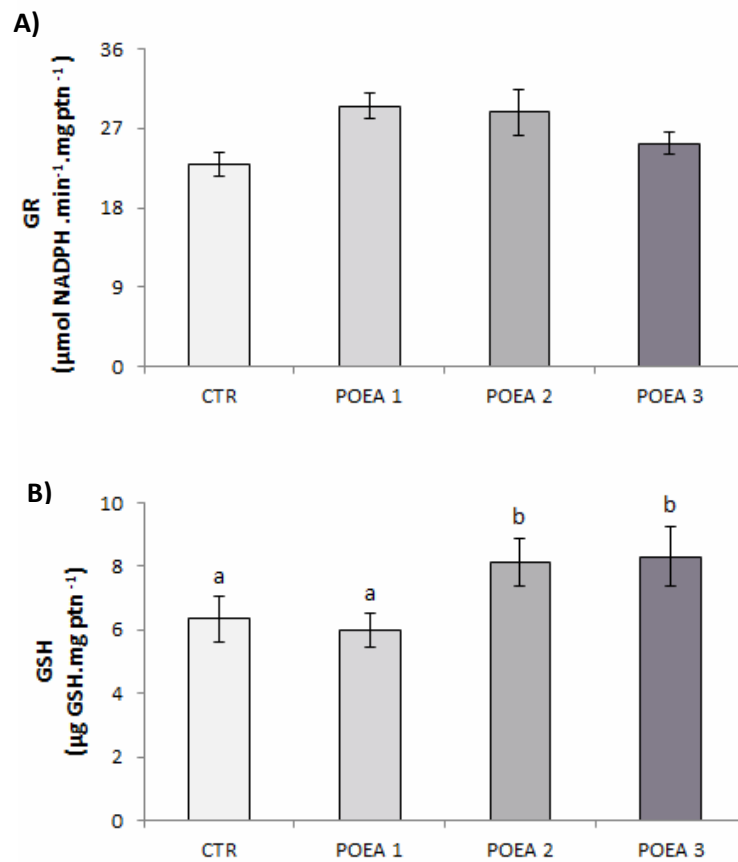
Os animais do grupo POEA 1 apresentaram um aumento significativo ($p = 0,031$) da atividade hepática da SOD, quando comparados ao seu grupo controle (Figura 15A). Para a enzima antioxidante catalase (CAT) houve uma diminuição significativa ($p = 0,030$) em todos os grupos expostos ao surfactante em comparação ao grupo controle (Figura 15B). A atividade hepática da GPx apresentou-se significativamente aumentada ($p = 0,002$) nos peixes do grupo POEA 3 (Figura 15C).

Figura 15 – Atividade hepática (média \pm EP, N=7-12) da SOD (A); CAT (B) e GPx (C) em *Prochilodus lineatus* expostos por 24 h apenas à água (CTR) ou a $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$ (POEA 1); $0,75 \text{ mg.L}^{-1}$ (POEA 2); $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ (POEA 3) do surfactante POEA. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).



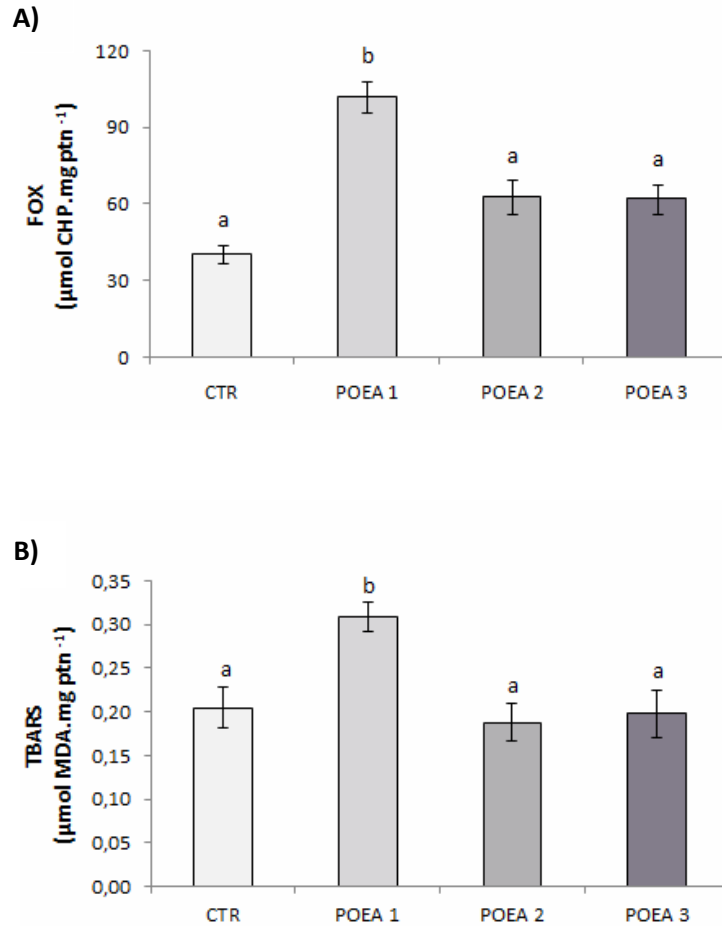
A GR não apresentou variação ($p = 0,062$) em sua atividade após a exposição dos animais às diferentes concentrações do POEA (Figura 16A). Já os níveis de GSH no fígado aumentaram significativamente ($p = 0,005$) nos peixes dos grupos POEA 2 e POEA 3 quando comparados ao grupo controle (Figura 16B).

Figura 16 – Valores (média \pm EP, N=6-12) da atividade da GR (A) e da concentração de GSH no fígado (B) de *Prochilodus lineatus* expostos por 24 h apenas à água (CTR) ou a $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$ (POEA 1); $0,75 \text{ mg.L}^{-1}$ (POEA 2); $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ (POEA 3) do surfactante POEA. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).



Um aumento significativo de peroxidação lipídica (Figura 17) foi detectado no fígado dos animais do grupo POEA 1, tanto pelo método FOX ($p \leq 0,001$) quanto pelo método TBARS ($p = 0,007$).

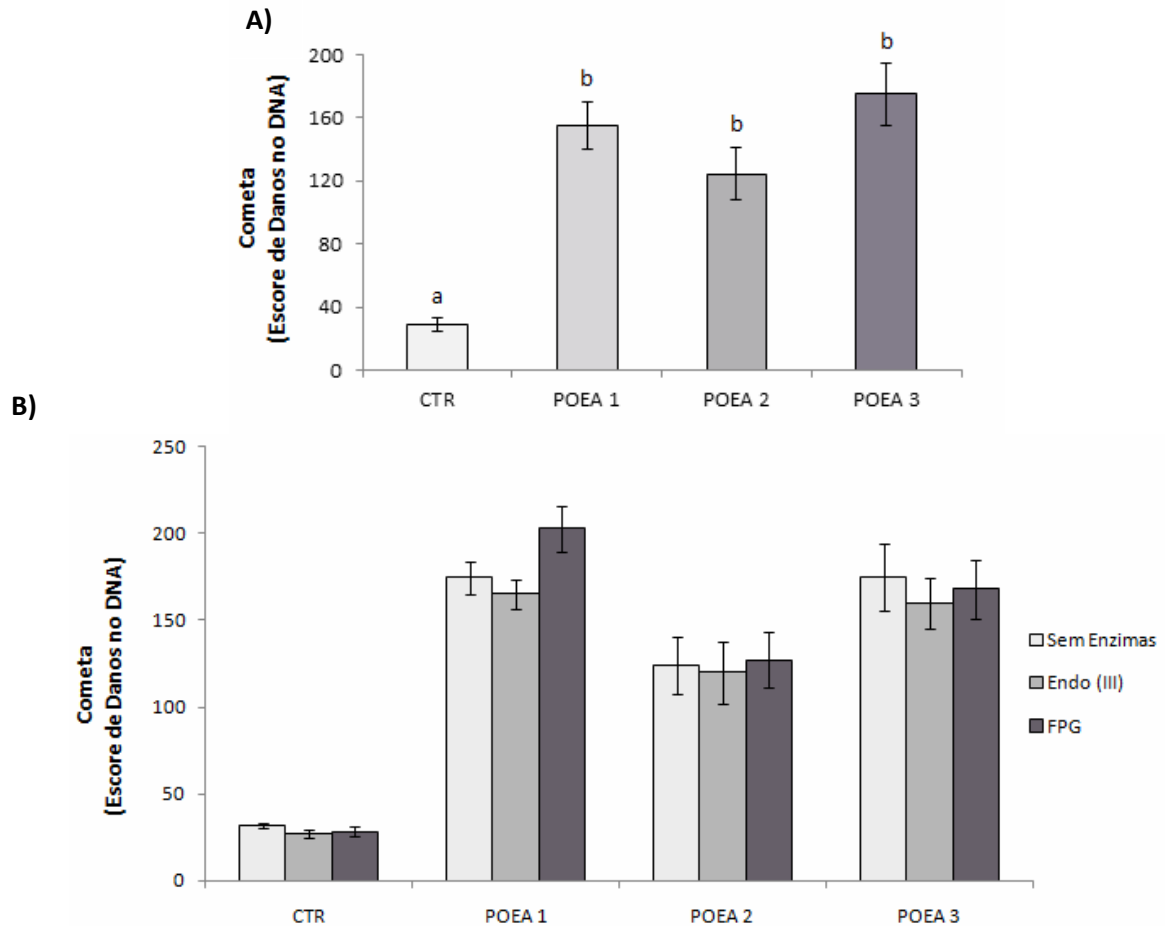
Figura 17 – Concentração hepática (média \pm EP, N=7-11) de hidroperóxido de cumeno (A) e MDA (B) em *Prochilodus lineatus* expostos por 24 h apenas à água (CTR) ou a 0,15 mg.L⁻¹ (POEA 1); 0,75 mg.L⁻¹ (POEA 2); 1,5 mg.L⁻¹ (POEA 3) do surfactante POEA. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).



4.2.2 Danos no DNA – Ensaio do Cometa

No ensaio do cometa padrão foi observado aumento significativo de danos no DNA nos peixes expostos a todas as concentrações avaliadas do surfactante ($p \leq 0,001$) quando comparados com o grupo controle (Figura 18A). O tipo de dano de maior frequência de ocorrência nestes peixes foi o de classe 2 (POEA 1: 49%; POEA 2: 40% e POEA 3: 42,1%). Já para o ensaio do cometa com o emprego das enzimas de restrição não foi encontrada diferença estatística de danos no DNA nas células tratadas com Endo (III) e FPG, em comparação com seus respectivos grupo controle (Figura 18B).

Figura 18 – Escore de danos no DNA (média \pm EP, N=7-14) obtidos pelo ensaio do cometa padrão (A) e pelo ensaio do cometa com o emprego das enzimas endo III e FPG (B) em *Prochilodus lineatus* expostos por 24 h apenas à água (CTR) ou a 0,15 mg.L⁻¹ (POEA 1); 0,75 mg.L⁻¹ (POEA 2); 1,5 mg.L⁻¹ (POEA 3) do surfactante POEA. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).



4.2.3 Parâmetros Fisiológicos

O cortisol plasmático dos peixes do grupo POEA 3 apresentou-se significativamente diminuído ($p = 0,020$) quando comparado com os peixes do grupo controle (Figura 19A). Já a glicose plasmática, não apresentou variação significativa ($p = 0,182$) em nenhuma das concentrações do surfactante em relação ao CTR (Figura 19B). Nos peixes expostos às três concentrações de POEA foi observado um aumento significativo na concentração do lactato plasmático em relação ao respectivo controle ($p = 0,001$).

A osmolalidade plasmática (Figura 20A) assim como, as concentrações plasmáticas de sódio (Figura 20B) e cloreto (Figura 20C) não variaram significativamente nos peixes expostos ao POEA ($p = 0,729$, $p = 0,080$ e $p = 0,061$, respectivamente) em relação aos animais do grupo controle. A atividade branquial da enzima NKA (Figura 21) também não apresentou variação significativa entre os grupos avaliados ($p = 0,720$).

Figura 19 – Concentrações plasmáticas (média \pm EP, N=6-10) de cortisol (A), glicose (B) e lactato (C) de *Prochilodus lineatus* expostos por 24 h à somente água (CTR) ou a 0,15 mg.L⁻¹ (POEA 1); 0,75 mg.L⁻¹ (POEA 2); 1,5 mg.L⁻¹ (POEA 3) do surfactante POEA. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

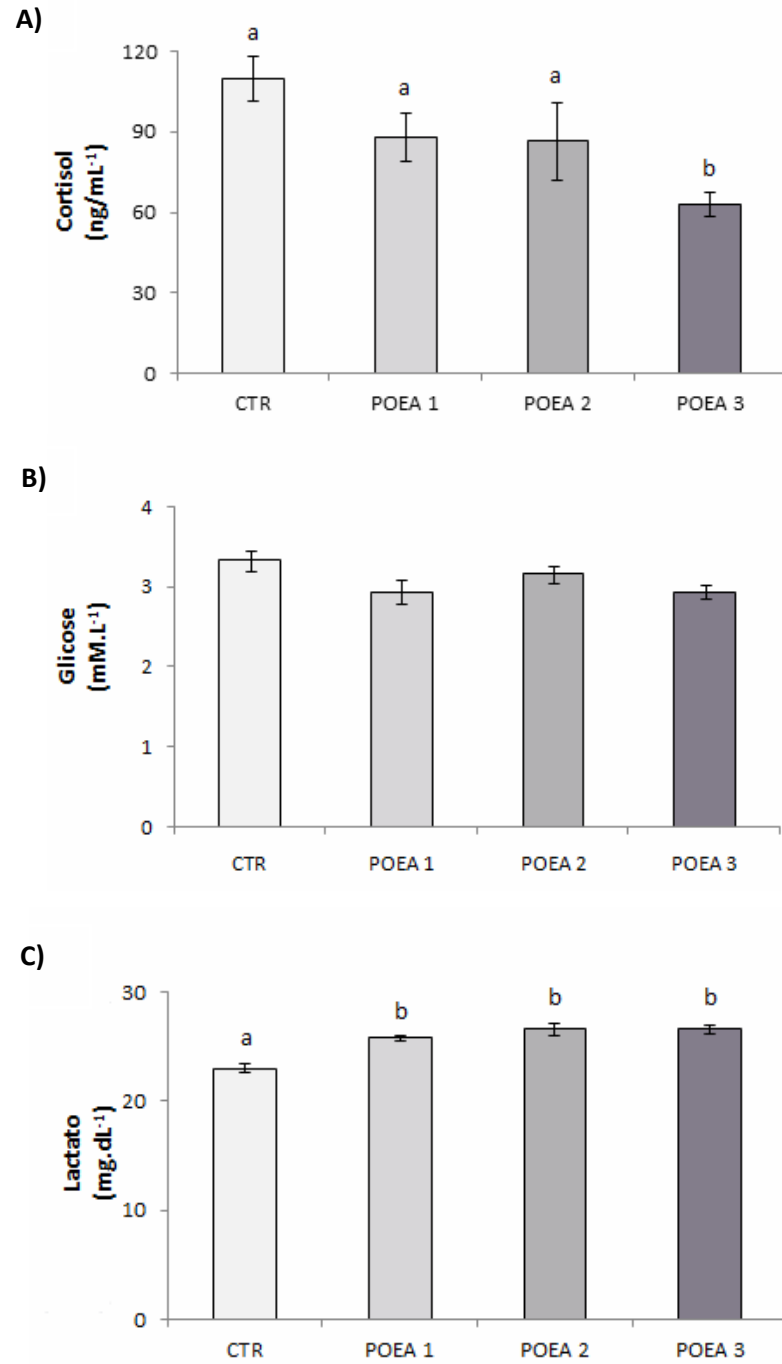


Figura 20 – Valores (média \pm EP, N=6-11) de osmolalidade (A) e das concentrações plasmáticas de sódio (B) e cloreto (C) de *Prochilodus lineatus* expostos por 24 h à somente água (CTR) ou a 0,15 mg.L⁻¹ (POEA 1); 0,75 mg.L⁻¹ (POEA 2); 1,5 mg.L⁻¹ (POEA 3) do surfactante POEA.

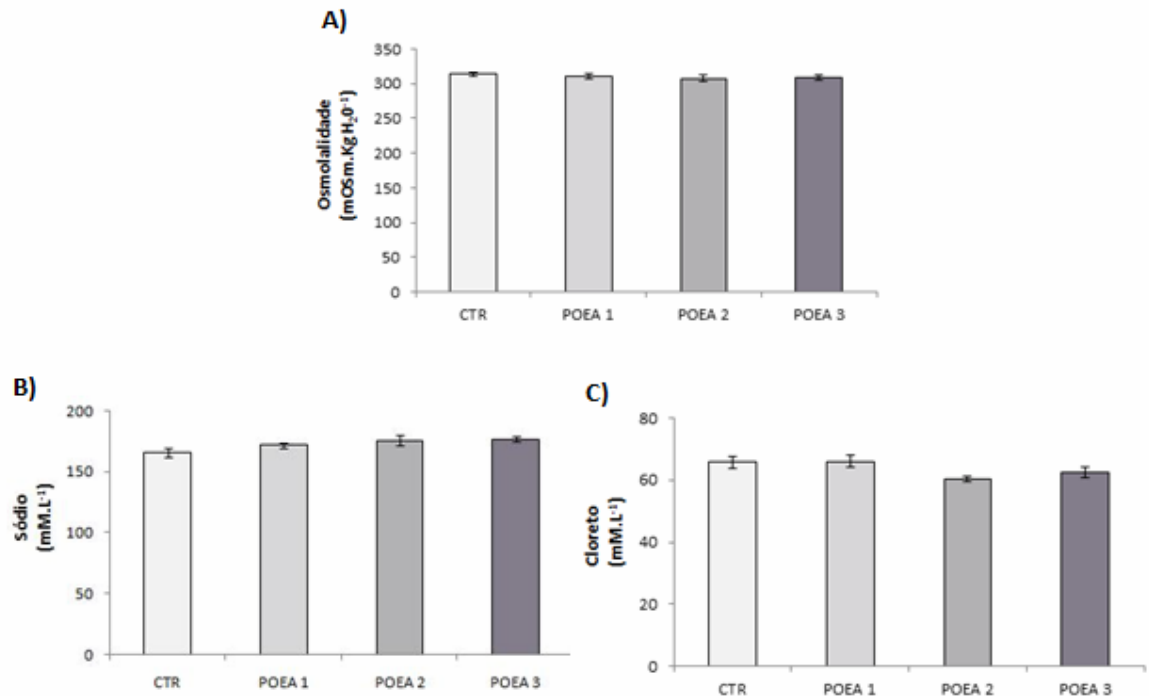
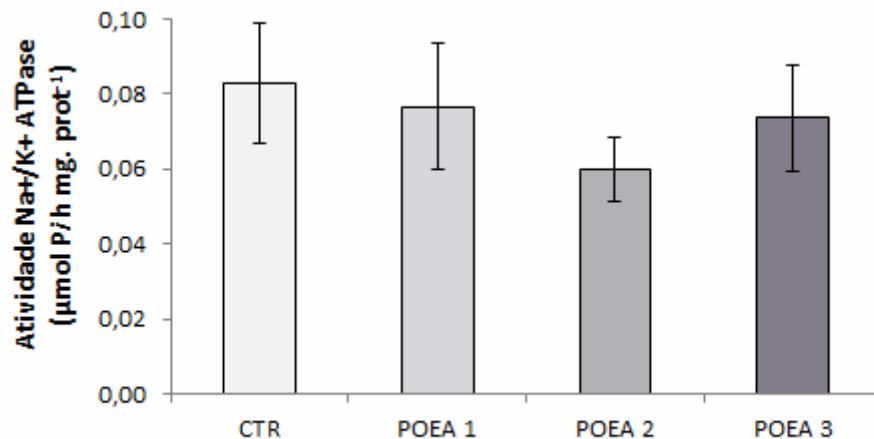
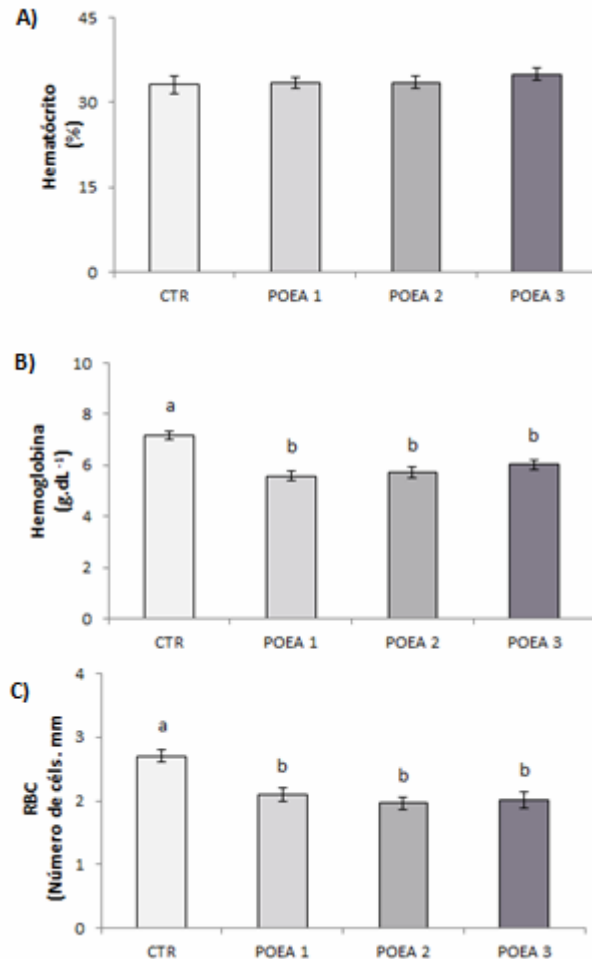


Figura 21 – Atividade branquial da enzima Na⁺/K⁺-ATPase (média \pm EP, N=7-9) de *Prochilodus lineatus* expostos por 24 h apenas à água (CTR) ou a 0,15 mg.L⁻¹ (POEA 1); 0,75 mg.L⁻¹ (POEA 2); 1,5 mg.L⁻¹ (POEA 3) do surfactante POEA.



A exposição dos peixes ao POEA não alterou o valor de hematócrito ($p = 0,659$) em relação ao grupo CTR (Figura 22A). Entretanto, os valores de hemoglobina (Figura 22B) e RBC (Figura 22C) dos peixes expostos às três concentrações de POEA apresentaram-se diminuídos significativamente quando comparadas aos respectivos controles ($p = 0,001$ para ambos).

Figura 22 – Valores (média \pm EP, N=12-22) de hematócrito (A), hemoglobina (B) e RBC (C) de *Prochilodus lineatus* expostos por 24 h apenas à água (CTR) ou a 0,15 mg.L⁻¹ (POEA 1); 0,75 mg.L⁻¹ (POEA 2); 1,5 mg.L⁻¹ (POEA 3) do surfactante POEA. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).



4.3 DISCUSSÃO

Testes de toxicidade com o glifosato e o Roundup[®] têm sido frequentemente empregados para a avaliação dos efeitos destes compostos em diferentes espécies de peixes sobre parâmetros fisiológicos (Gluszczak et al., 2006; Langiano e Martinez, 2008; Modesto e Martinez, 2010ab), bioquímicos (Neskovic et al., 1996; Gluszczak et al., 2007) e genéticos (Cavalcante et al., 2008; Guilherme et al., 2012a, 2012b). Dados na literatura descrevem o aumento da toxicidade do produto formulado quando comparado ao composto ativo. Os autores relacionam este aumento com a adição de surfactantes ao produto comercializado (Giesy et al., 2000; Tsui e Chu, 2003). Neste contexto que o presente estudo avaliou os efeitos tóxicos do surfactante POEA para a espécie nativa de peixe *P. lineatus*.

A indução na atividade catalítica da CYP1A em peixes expostos a compostos orgânicos está bem estabelecida (Arukwe et al, 2008; Simonato et al., 2011). Assim como constatado neste trabalho, a exposição de *P. lineatus* às duas maiores concentrações do surfactante promoveu um

aumento significativo na atividade catalítica da CYP1A, porém ainda não existem dados referentes às vias de metabolização do surfactante. Dados sugerem que o aumento da EROD encontrada para as concentrações de POEA 2 e POEA 3 podem resultar de um efeito indireto do surfactante, uma vez que estudos indicam que tecidos com altos níveis de GSH modulam o receptor aril hidrocarboneto (Ah) de modo a promover um aumento na expressão e atividade catalítica da CYP1A (Otto et al., 1995; Van der Oost et al., 2003). Uma diminuição na atividade hepática da GST em peixes expostos as concentrações de POEA 2 e POEA 3 sugere a presença de oxidantes capazes de causarem a inibição de sua atividade (Bagnyukova et al., 2006). Esta hipótese pode ser confirmada pelo estudo de Hermes Lima e Storey (1993), que apontam a sensibilidade da GST a pró-oxidantes. No estudo de Modesto e Martinez (2010a), a exposição de *P. lineatus* ao Roundup Transorb[®] por 6 e 24 h provocou uma inibição na atividade hepática da GST. Este resultado também foi observado em peixes expostos por 96 h ao Roundup Original[®] (Lushchak et al., 2009). A exposição crônica de peixes, *Rhamdia quelen*, às pequenas concentrações de 0,45 e 0,95 mg.L⁻¹ de Roundup[®] também foram capazes de reduzir a atividade desta enzima (Menezes et al., 2011). Para girinos (*Rhinella arenarum*), a exposição ao Roundup Ultra[®] também foi capaz de inibir atividade da GST (Lajmanovich et al., 2010). Os resultados observados no presente estudo corroboram os dados apresentados na literatura e sugerem que a inibição da GST, constantemente verificada para os produtos formulados, pode estar relacionada à adição do surfactante ao herbicida e aos efeitos pró-oxidantes exercidos pelo POEA.

Quanto às enzimas antioxidantes, foi observado um aumento na atividade da SOD na menor concentração do surfactante (POEA 1) e redução na atividade da CAT em todas as concentrações do surfactante. A relação entre geração de espécies reativas de oxigênio e indução na atividade das enzimas antioxidantes é bastante complexa (Halliwell e Gutteridge, 2005). Sabe-se que as respostas adaptativas relacionadas ao combate de espécies reativas de oxigênio (ERO), podem sofrer influência dos produtos gerados pelas ERO. Um excesso de peróxido de hidrogênio pode reduzir a atividade da SOD, enquanto que o acúmulo do ânion superóxido pode ser o responsável pela inibição da atividade da catalase (Bagnyukova et al., 2006). Esses dados reforçam a ideia de um aumento nas concentrações do ânion superóxido, uma vez que a indução da SOD pode ocorrer durante uma alta produção do radical ânion superóxido (Oruc, 2012), enquanto que o excesso deste radical promove a inibição da catalase. Em estudos com a exposição aguda de peixes *P. lineatus* ao Roundup Transorb[®] também foi observada a inibição na atividade da catalase hepática (Guilherme et al., 2012b; Modesto e Martinez, 2010a). Desta forma, a inibição da catalase hepática apresentada tanto para os produtos formulados quanto para o surfactante sugere que a alteração na atividade desta enzima pode ser um sinal específico de interferência do POEA nas defesas antioxidantes do peixe. Devido à alta capacidade de reorganização dos componentes do sistema antioxidante, a alteração na atividade da catalase não está diretamente relacionada ao aumento nos níveis de produtos de peroxidação lipídica em fígado (Hermes Lima et al, 2001; Hermes Lima, 2004).

O aumento na atividade da GPx em peixes expostos à maior concentração do surfactante (POEA 3) indica estimulação da via antioxidante, provavelmente pelo aumento de peróxidos. Modesto e Martinez (2010a) apresentaram o mesmo resultado após a exposição de *P. lineatus* ao Roundup Transorb[®]. Os autores relacionaram o aumento da atividade da GPx como resposta compensatória à inibição da catalase (Modesto e Martinez, 2010a). Estes dados corroboram os resultados obtidos para a exposição de peixes ao surfactante, sugerindo que o POEA promove alteração no equilíbrio redox e que o aumento na atividade da GPx pode estar relacionado a tentativa de restabelecer um equilíbrio entre defesa antioxidante e geração de espécies reativas de oxigênio.

Neste trabalho, para as concentrações de POEA 2 e POEA 3 foi observado um aumento nas concentrações de GSH hepática. Este dado mostra um importante papel antioxidante que a glutatona exerce como primeira linha de defesa (Ahmad et al., 2000). Em casos de estresse oxidativo pode ocorrer uma biossíntese de antioxidantes (Winston e Di Giulio, 1991) e entre seus papéis a GSH pode atuar diretamente nas espécies reativas de oxigênio a fim de promover sua neutralização e evitar danos oxidativos (Hermes Lima, 2004). Estes dados associados aos resultados encontrados para peroxidação lipídica indicam que o aumento nas concentrações hepáticas de GSH pode estar relacionado à proteção das membranas plasmáticas contra os danos oxidativos. Outros estudos com testes de toxicidade aguda também observaram aumento da GSH em resposta a concentrações subletais de herbicidas (Oropesa et al., 2009; Modesto e Martinez, 2010b). Zhang e colaboradores (2004) relatam que o conteúdo hepático de GSH de peixes pode aumentar como resultado de um mecanismo de adaptação para um estado oxidativo, e que esta alteração provém do aumento da síntese de GSH, que é provavelmente o que aconteceu no presente trabalho, visto que não houve aumento na atividade da GR. De fato, o aumento nas concentrações de GSH pode ocorrer por duas vias: aumento em sua síntese ou reciclagem pela via GSH/GSSH, que depende da GR (Van der Oost et al., 2003), a qual não apresentou alteração em sua atividade para nenhuma das concentrações avaliadas do POEA. Além de papel antioxidante, a GSH também está relacionada com a modulação do receptor aril hidrocarboneto (Ah) e o aumento no conteúdo de GSH pode promover aumento na expressão e atividade catalítica da CYP1A, demonstrando a interação entre GSH e sistema citocromo P450 (Otto et al., 1995; Van der Oost et al., 2003). Esta relação pode ser observada no presente trabalho, pois houve aumento tanto no conteúdo hepático de GSH, quanto na EROD, nos peixes expostos às duas maiores concentrações de POEA.

Quando não neutralizadas, as espécies reativas de oxigênio podem reagir com lipídeos da membrana (Ahmad et al., 2000), produzindo peroxidação lipídica, a qual é considerada uma das consequências do estresse oxidativo (Hermes Lima, 2004). No presente estudo, a ocorrência de peroxidação lipídica foi indicada pelo aumento nos níveis tanto de hidroperóxido lipídico (FOX), que é um produto derivado da fase inicial da peroxidação lipídica, como também pelo aumento nos níveis de malondialdeído (TBARS), que é resultado final da peroxidação lipídica (Lima e Abdalla, 2001). Por meio de ambas as metodologias foi constatado o aumento de peroxidação lipídica para a

concentração de POEA 1. Assim, pode ser inferido que as defesas antioxidantes para esta concentração foram insuficientes, acarretando no aumento de peroxidação lipídica em função da presença do surfactante POEA. Sugere que para os peixes expostos ao POEA 2 e POEA 3 a LPO foi evitada pelo aumento no conteúdo hepático de GSH nestas concentrações do surfactante. Vários estudos já apontaram efeitos de peroxidação lipídica para diferentes organismos expostos ao Roundup® (Guilherme et al., 2010; Modesto e Martinez, 2010a, 2010b; Menezes et al., 2011; Rossi et al., 2011), e o presente estudo vem de encontro com os dados apresentados na literatura apontando uma potencial contribuição do POEA ao processo de LPO observado em formulações de Roundup®.

O grau de integridade do DNA tem sido proposto como um indicador sensível de genotoxicidade para uma variedade de compostos (Zhu et al., 2005). Neste trabalho os resultados apontam que o POEA é genotóxico para o peixe *P. lineatus*. Na versão alcalina do ensaio cometa padrão foram observadas lesões no DNA de eritrócitos expostos ao surfactante para todas as concentrações avaliadas em um período de 24 horas. Estes dados corroboram o estudo de Guilherme e colaboradores (2012a), onde a exposição de peixes (*Anguilla anguilla*) ao POEA também foi capaz de causar danos ao DNA. A genotoxicidade do Roundup® também já foi avaliada para *P. lineatus* (Cavalcante et al., 2008) e os efeitos genotóxicos do produto formulado quando comparado ao POEA isoladamente, não se apresentam aumentados. De fato, estudos recentes descartam interação sinérgica do glifosato e o surfactante para promover danos ao DNA (Guilherme et al., 2012a) e mostram que tanto o princípio ativo (glifosato), quanto o surfactante POEA, tem ação genotóxica. Com intuito de aumentar a sensibilidade do ensaio do cometa foram adicionadas endonucleases de restrição, que são capazes de reconhecer lesões no DNA não reparadas e converter em quebras de DNA adicionais (Kienzler et al., 2012). Com base nos resultados obtidos sugere-se que a oxidação de bases do DNA não foi o mecanismo dominante de danos observados nos peixes expostos ao surfactante, assim como no estudo de Guilherme e colaboradores (2012a). No entanto, a avaliação de danos às bases do DNA não descarta a hipótese de que as lesões no DNA encontradas para os peixes expostos ao POEA são provenientes de danos oxidativos. Neste estudo foi apontado um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e além de interagirem com as bases, as ERO podem também oxidar outros componentes do DNA como os açúcares, as ligações entre bases e grupamento fosfato (Breen e Murphy, 1995).

Neste estudo a concentração plasmática de cortisol após a exposição dos peixes a 1,5 mg.L⁻¹ de POEA se apresentou diminuída, indicando que a concentração mais elevada do surfactante interfere na resposta de estresse. Alguns estudos já avaliaram a atuação do Roundup® como desregulador endócrino para a espécie de peixe *Rhamdia quelen* (Soso et al., 2007; Cericato et al., 2008) e segundo estudo de Cericato e colaboradores (2009), este efeito não está relacionado com a produção e/ou liberação de cortisol pelas células interrenais, sugerindo que a resposta diminuída do cortisol pode estar relacionada com a regulação em níveis mais elevados do eixo HPI, ou seja, hipotálamo e/ou hipófise. Baseado no presente estudo pode-se supor que os efeitos encontrados para o

produto formulado podem estar relacionados com a presença do surfactante no produto comercializado, e que o POEA pode atuar nas vias avaliadas por Cericato e colaboradores (2009), uma vez que ainda não foram detectados efeitos do glifosato como desregulador endócrino.

Neste estudo, a concentração de glicose plasmática após 24 h de exposição dos peixes ao surfactante não se apresentou alterada. Este efeito pode estar relacionado à interferência que o surfactante exerceu na resposta de estresse. É bem descrito na literatura que a resposta hiperglicêmica em muitas espécies de teleósteos é mantida pela atuação da adrenalina e do cortisol (Wendelaar Bonga, 1997). A liberação da adrenalina na circulação ocorre rapidamente (>30 min) após o estresse, porém a manutenção de níveis elevados de glicose no sangue por períodos prolongados é papel supostamente desempenhado pelo cortisol (Barton, 2002). A resposta diminuída de cortisol para o tempo de 24 h de exposição pode ser sugerido como responsável pela manutenção da glicemia. Por outro lado, também pode ser sugerido a hipótese de que o POEA isoladamente não foi capaz de provocar uma resposta hiperglicêmica, uma vez que este efeito foi observado em *P. lineatus* expostos ao Roundup® (Langiano e Martinez, 2008), sugerindo para este parâmetro um efeito exercido apenas pelo glifosato ou ainda um efeito sinérgico entre glifosato e POEA.

A exposição de *P. lineatus* às concentrações avaliadas do surfactante em um período de 24 h não alterou as concentrações plasmáticas dos íons Na^+ e Cl^- . Estes resultados corroboram os de Langiano e Martinez (2008), que após a exposição aguda de *P. lineatus* ao Roundup® às concentrações de 7,5 e 10 mg.L^{-1} , também não observaram alterações nas concentrações de Na^+ plasmático para os três tempos de exposição avaliados (6, 24 e 96 horas). Quanto à atividade da NKA, esta também não apresentou variação após a exposição ao surfactante nas concentrações e período avaliado. Estes resultados demonstram que a exposição aguda de peixes ao surfactante nas concentrações estudadas, não interferem nos parâmetros iônicos e atividade da NKA.

Alterações nos parâmetros hematológicos em resposta a estressores químicos são tidas como não específicas, mas ainda assim podem fornecer informações importantes em estudos de avaliação dos efeitos destes compostos sobre a fisiologia geral e o estado de saúde do organismo (Beyer, 1996). A exposição de *P. lineatus* ao surfactante diminuiu o número de células sanguíneas (RBC) para todas as concentrações avaliadas, sugerindo lise celular. Este resultado pode ser reforçado pelo grande número de danos encontrados no DNA de eritrócitos de peixes expostos ao POEA e também pelos efeitos oxidativos encontrados neste trabalho. Outros trabalhos também apontam a diminuição no RBC de peixes expostos ao Roundup® (Glusckak et al., 2006; Salbego et al., 2010). Frente ao resultado apresentado pelo presente trabalho e dados da literatura, é possível inferir a contribuição do POEA na diminuição do RBC dos peixes expostos ao herbicida. Quanto à hemoglobina, a exposição de *P. lineatus* ao surfactante também provocou uma diminuição em seu conteúdo. Este efeito deve estar diretamente relacionado com a diminuição no número de eritrócitos. A diminuição no conteúdo de hemoglobina sanguínea acarreta em situação de hipóxia funcional. Alguns estudos já relataram hipóxia após a exposição de peixes (Gluszczak et al., 2006), ratos (EPA –

US, 1922), eritrócitos humanos (Batista et al., 2007) e humanos (Delgado e Paumgarten, 2004) ao Roundup[®]. Este resultado de hipóxia nos peixes expostos ao surfactante pode ser sustentado pelo aumento de lactato plasmático observado nos animais expostos a qualquer uma das três concentrações do POEA avaliadas neste estudo. Na literatura alguns trabalhos relacionam diretamente a situação de hipóxia com o aumento de lactato plasmático (Holeton e Randall, 1967; Panepucci et al., 2001; Herbert e Steffensen, 2005) e apontam que a elevação nos níveis plasmáticos de lactato em condições de hipóxia denota um aumento do metabolismo anaeróbico. Assim, os efeitos do POEA nos parâmetros hematológicos apontar que o surfactante contribui para a destruição de células vermelhas, podendo levar conseqüentemente à hipóxia funcional.

Baseado nos resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir que o POEA é tóxico para *Prochilodus lineatus* e que muitos dos efeitos observados na exposição de peixes ao Roundup[®] podem estar relacionados com a adição do surfactante ao produto comercializado. Os resultados mostram danos em vários níveis organizacionais, e que tais danos como: hemólise, danos ao DNA e peroxidação lipídica estão diretamente relacionados a um desequilíbrio no estado redox do peixe. Assim, pode-se concluir que a exposição ao POEA gera uma situação de estresse oxidativo.

5 INTERFERÊNCIA DO SURFACTANTE POLIOXIETILENO AMINA (POEA) NA RESPOSTA DE ESTRESSE DO TELEÓSTEO *PROCHILODUS LINEATUS*

Neste capítulo estão descritos os experimentos e resultados referentes à avaliação da interferência do surfactante polioxietileno amina (POEA) na resposta de estresse do peixe *Prochilodus lineatus*. Para tanto, foram avaliados os seguintes parâmetros fisiológicos: as variáveis hematológicas RBC, hematócrito e hemoglobina, concentrações plasmática de cortisol, glicose, Na⁺ e Cl⁻ e a atividade branquial da Na⁺/K⁺ - ATPase.

5.1 MATERIAL E MÉTODOS

5.1.1 Animais

Juvenis de *P. lineatus* com massa corpórea de $15,72 \pm 2,33$ g (média \pm DP, n = 152) foram fornecidos pela Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina (EPUEL). Os peixes foram aclimatados durante 7 dias, em tanques de 300 L, com água desclorada e aeração constante. Os parâmetros físicos e químicos da água foram monitorados usando uma sonda para multiparâmetros (Horiba U-50) e mantiveram-se em condições adequadas para a realização dos experimentos (média \pm EP): temperatura $20,9 \pm 1,9$ °C; pH $7,5 \pm 0,9$; oxigênio dissolvido $7,5 \pm 0,8$ mg.L⁻¹; condutividade $123,7 \pm 1,9$ μ S.cm⁻¹ e o fotoperíodo ajustado para 12h/12h. Os animais foram alimentados no segundo, quarto e sexto dia de aclimação e a alimentação foi suspensa 24 h antes e durante a realização dos experimentos.

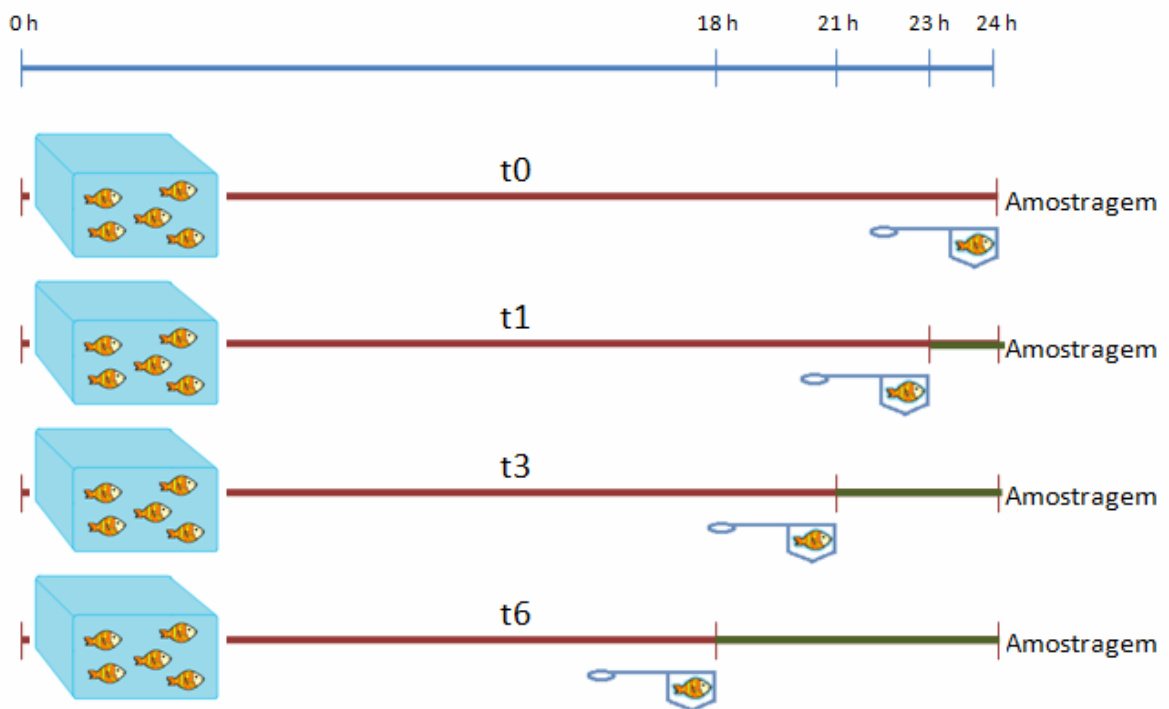
5.1.2 Delineamento Experimental e Amostragem

Após o período de aclimação, os animais foram transferidos para aquários de 100 L (9 a 10 por aquário), contendo 80 L de água desclorada com ou sem o surfactante POEA, onde foram mantidos por um período de 24 h. Os peixes foram divididos em quatro grupos: i) grupo Controle: peixes mantidos em água desclorada por 24 h, este grupo não foi submetido ao estresse aéreo ou exposto ao POEA; ii) grupo POEA: peixes expostos por 24 h a 0,15 mg.L⁻¹ de POEA, este grupo não foi submetido ao estresse aéreo; iii) grupo Estresse: peixes mantidos em água desclorada durante 24 h e submetidos ao estresse aéreo e iv) grupo POEA + Estresse: peixes expostos por 24 h a 0,15 mg.L⁻¹ de POEA e submetidos ao estresse aéreo. Os peixes dos grupos iii e iv foram submetidos a um estresse agudo, para tanto animais foram removidos do aquário individualmente com uma rede e expostos ao ar por 3 min. Os animais destes dois grupos foram subdivididos em quatro grupos: um grupo de animais submetidos ao estresse aéreo e imediatamente amostrados (t0) e três grupos de animais submetidos ao estresse aéreo, transferidos para um novo aquário contendo o mesmo meio da

pré-exposição (somente água ou $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$ de POEA) e amostrados após 1 h (t1), 3 h (t3) e 6 h (t6) (Figura 23).

Os animais dos grupos i e ii também foram subdivididos em quatro grupos: grupo de animais que **não** foram submetidos ao estresse aéreo e foram imediatamente amostrados (t0) e três grupos de animais que **não** foram submetidos ao estresse aéreo, mas foram transferidos individualmente para novos aquários, contendo o mesmo meio da pré-exposição (somente água ou $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$ de POEA), e amostrados após 1 h (t1), 3 h (t3) e 6 h (t6). A fim de minimizar a indução de estresse durante a transferência dos peixes dos grupos i e ii, estes animais foram removidos rapidamente a partir de um aquário para o outro, com uma pequena rede, evitando a exposição aérea (Figura 23).

Figura 23 – Esquema representando o desenho experimental dos testes de exposição para o grupo estresse. A linha vermelha representa a presença dos peixes no primeiro aquário e a linha verde representa a transferência dos animais para um novo aquário.



A concentração do surfactante POEA (CAS: 24991-53-5, Sigma-Aldrich P9906) utilizada neste capítulo foi definida considerando: (i) concentração ambientalmente realista (Giesy et al., 2000) e (ii) estudo realizado no capítulo 4 deste trabalho.

Os animais foram sempre amostrados ao meio-dia e para reduzir o estresse durante a amostragem, os peixes foram individualmente removidos do aquário com o auxílio de uma pequena rede e foram imediatamente anestesiados em benzocaína ($0,12 \text{ g.L}^{-1}$) e, com auxílio de seringas heparinizadas, foi retirado o sangue pela veia caudal. Após a coleta de sangue os animais foram

mortos por secção medular para a retirada das brânquias. Estes procedimentos estão de acordo com os protocolos aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (Processo 35004.2011.18). Amostras de sangue foram armazenadas em tubos plásticos para as análises posteriores. Os arcos branquiais foram lavados com solução salina (NaCl, 154 mM e sacarose, 25 mM). Para a determinação da atividade da Na^+/K^+ -ATPase (NKA), os filamentos das brânquias foram separados dos arcos branquiais e armazenados em tampão SEI (300 mM de sacarose, 0,1 mM de EDTA e 30 mM de Imidazol) em freezer (-20°C).

5.1.3 Parâmetros Fisiológicos

Uma alíquota de sangue foi utilizada para a determinação do hematócrito, por microcentrifugação (1.200 g; 5 min) em tubos capilares e o conteúdo de hemoglobina foi estimado pelo método colorimétrico com cianeto metahemoglobina, utilizando-se kit comercial (Labtest Diagnóstica, Brasil) em espectrofotômetro (Libra S32, Biochrom, Reino Unido) a 540 nm. O número de eritrócitos por mm^3 de sangue (RBC) foi determinado em amostras de sangue fixadas em tampão formol citrato, utilizando-se câmara de Neubauer.

O sangue foi centrifugado (10 min, 1870 g) e o plasma separado e armazenado em freezer (-20°C). O cortisol plasmático foi determinado por imunoensaio, com a utilização de kit comercial (Monobind Inc., USA) em leitora de microplacas (ELX 800, BioTek, USA), a 450 nm. A glicose plasmática foi analisada pelo método da glicose oxidase, usando kit comercial (Labtest Diagnóstica, Brasil), em espectrofluorímetro de microplacas (Victor 3, Perkin Elmer, USA), a 505 nm.

A concentração plasmática de cloreto foi avaliada pelo método do tiocianato de mercúrio com auxílio do kit comercial (Labtest, Brasil) em espectrofluorímetro de microplacas, a 470 nm. O plasma foi diluído em água destilada (1:100) para a determinação da concentração do íon sódio, em fotômetro de chama (900, Analyser, Brasil).

Para a determinação da atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase (NKA), os filamentos branquiais de cada animal foram homogeneizados em tampão SEI (1:10 p/v) e centrifugados (15 min; 7500 g; 4°C). O sobrenadante foi utilizado para medir a atividade da NKA de modo indireto, através da produção de fosfato inorgânico proveniente da quebra de ATP, em amostras incubadas com KCl e com ouabaína (Quabius et al., 1997). E como padrão foi utilizada solução de fósforo de 650 μM (Sigma). Os ensaios foram realizados em leitora de microplacas (ELX 800, BioTek, USA) a 620 nm. A concentração de proteína no homogeneizado branquial foi quantificada pelo método de Lowry et al. (1951), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

5.1.4 Análise Estatística

Os valores médios obtidos para cada grupo experimental (Controle, POEA, Estresse e POEA + Estresse), em um mesmo tempo de amostragem (t_0 , t_1 , t_3 ou t_6), foram comparados entre si através de análise de variância paramétrica (one-way ANOVA) ou não paramétrica (teste Kruskal-Wallis), de acordo com a distribuição dos dados (normalidade e homogeneidade de variância). Quando necessário, para a identificação das diferenças, foi aplicado o teste de comparações múltiplas SNK (Student-Newman-Keuls). Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

5.2 RESULTADOS

Durante os testes, não houve mortalidade em nenhum grupo experimental e os parâmetros da água foram monitorados e mantiveram-se em: temperatura $21,9 \pm 0,6$ °C; oxigênio dissolvido $7,89 \pm 0,9$ mg O₂.L⁻¹; pH $7,4 \pm 0,9$ e condutividade $121 \pm 7,8$ μS cm⁻¹.

5.2.1 Resposta de Estresse

Nos animais somente submetidos ao estresse aéreo, ou seja, grupo Estresse, o cortisol plasmático aumentou significativamente após 1 h ($p < 0,001$) e 3 h ($p < 0,001$) da aplicação do estímulo estressor, quando comparados aos respectivos animais controles (Figura 24A). A glicemia plasmática se apresentou significativamente aumentada nos animais do grupo Estresse no tempo t_0 , ou seja, imediatamente após a aplicação do estresse aéreo ($p < 0,001$), a qual se manteve elevada após 1 h ($p < 0,001$) e 3 h ($p = 0,001$) da exposição aérea, em comparação aos respectivos grupos controles (Figura 24B).

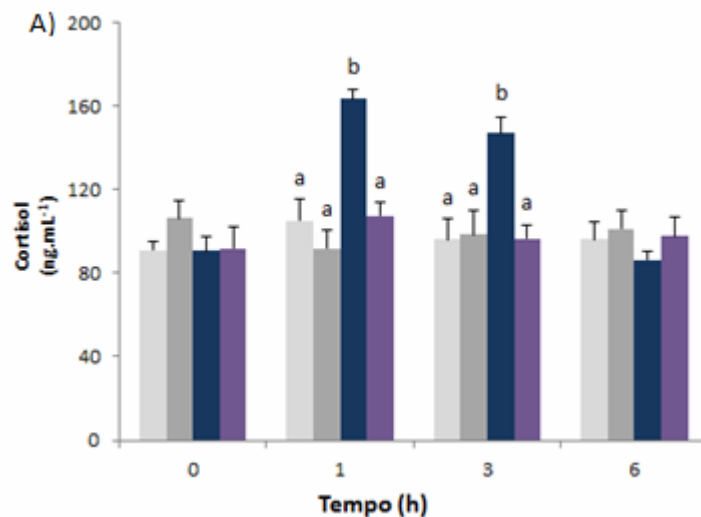
A concentração plasmática de Na⁺ (Figura 25A) e a atividade branquial da enzima Na⁺/K⁺ - ATPase (Figura 26) diminuíram significativamente ($p \leq 0,001$, para ambos) nos animais do grupo Estresse após o período t_0 , que corresponde ao grupo amostrado imediatamente após o estímulo estressor, quando em comparação ao respectivos grupos controles. Já os valores da concentração plasmática de cloreto (Figura 25B) se mantiveram inalterados em todos os grupos e períodos avaliados (t_0 , $p = 0,194$; t_1 , $p = 0,515$; t_3 , $p = 0,780$ e t_6 , $p = 0,741$).

Quanto aos parâmetros hematológicos, somente após o período de t_0 foram observadas alterações nos valores de RBC (Figura 27A), hematócrito (Figura 27B) e hemoglobina (Figura 27C). Estes parâmetros se apresentaram significativamente aumentados ($p = 0,001$; $p = 0,003$; $p < 0,001$, respectivamente) quando comparados aos respectivos controles.

5.2.2 Interferência do POEA na Resposta de Estresse

O cortisol e a glicose plasmática de *P. lineatus* pertencentes ao grupo POEA + Estresse foram significativamente menores quando comparados ao grupo de peixes submetidos somente ao estresse aéreo, nos períodos de 1 e 3 h após a exposição aérea (Figura 24A e 24B). Quando comparados aos grupos POEA e Controle, os animais expostos ao surfactante e submetidos ao estresse aéreo não apresentaram alterações nas concentrações plasmáticas de cortisol ($p > 0,288$) e glicose ($p > 0,070$), para nenhum dos períodos avaliados (Figura 24A e 24B).

Figura 24 – Concentrações plasmáticas (média \pm EP, N= 5-10) de cortisol (A) e glicose (B) de *Prochilodus lineatus* de diferentes grupos experimentais (CTR, POEA, Estresse e POEA + Estresse) amostrados imediatamente (0) ou após 1, 3 e 6 h da exposição aérea (Estresse e POEA + Estresse) ou apenas da transferência de aquários (CTR e POEA). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos, para um mesmo período de tempo ($p < 0,05$).



Peixes pré-expostos ao surfactante e submetidos ao estresse aéreo apresentaram uma diminuição significativa na concentração plasmática do íon sódio e na atividade branquial da enzima Na^+/K^+ -ATPase, após os períodos de t0 ($p < 0,001$, para ambos) e t1 ($p = 0,049$ e $p = 0,007$, respectivamente), quando comparados aos respectivos grupos controles (Figura 25A e 26). Para a concentração plasmática do cloreto, como mencionado anteriormente, não foi observada

Figura 25 – Concentrações plasmáticas (média \pm EP, N= 6-11) de sódio (A) e cloreto (B) de *Prochilodus lineatus* de diferentes grupos experimentais (CTR, POEA, Estresse e POEA + Estresse) amostrados imediatamente (0) ou após 1, 3 e 6 h da exposição aérea (Estresse e POEA + Estresse) ou apenas da transferência de aquários (CTR e POEA). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos, para um mesmo período de tempo ($p < 0,05$).

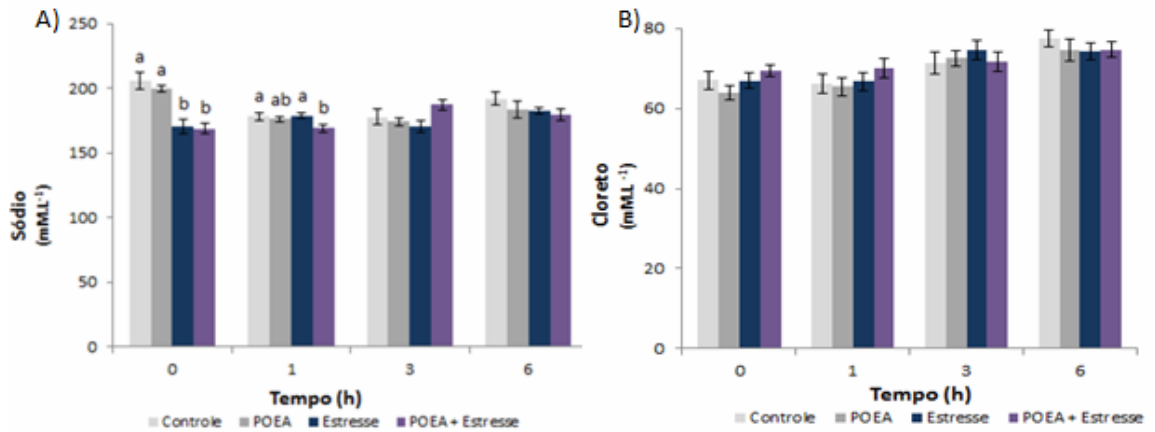
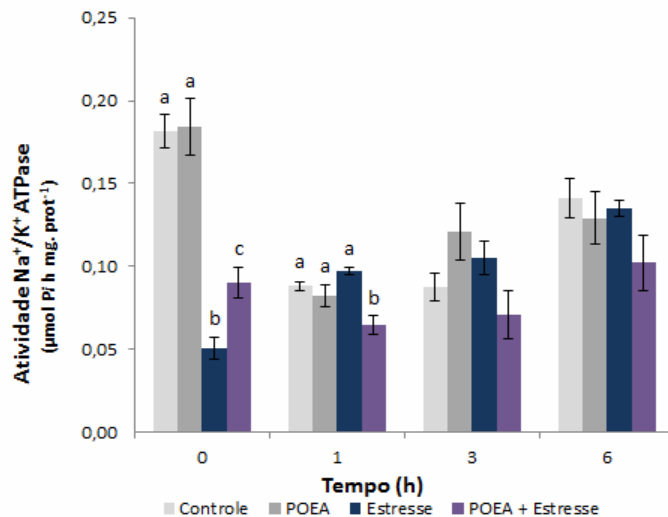
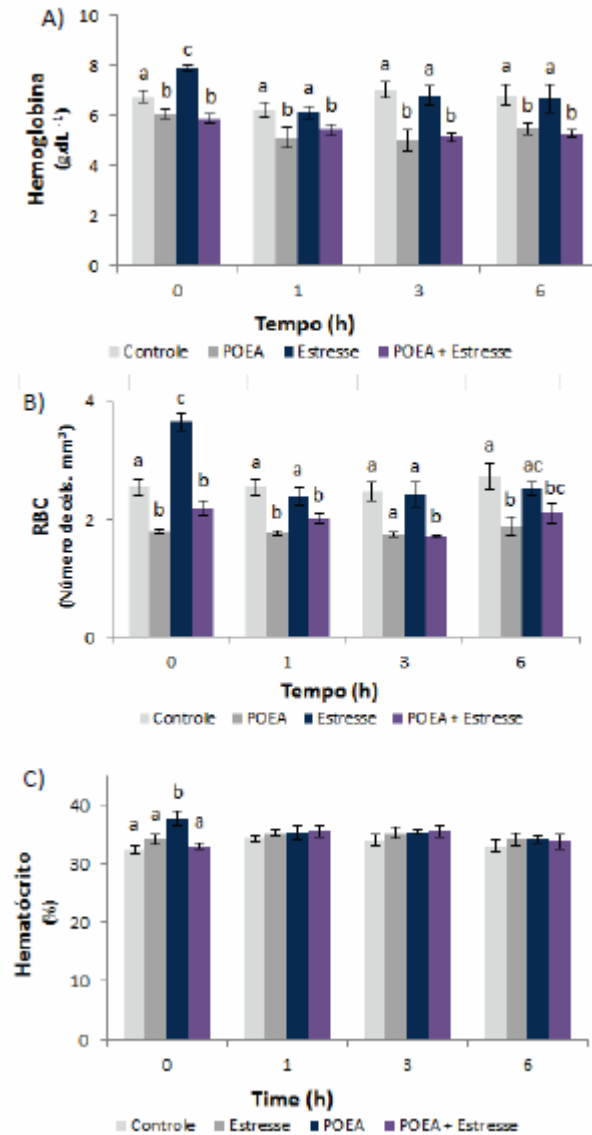


Figura 26 – Atividade branquial da enzima Na⁺/K⁺ -ATPase (média \pm EP, N= 5-8) de *Prochilodus lineatus* de diferentes grupos experimentais (CTR, POEA, Estresse e POEA + Estresse) amostrados imediatamente (0) ou após 1, 3 e 6 h da exposição aérea (Estresse e POEA + Estresse) ou apenas da transferência de aquários (CTR e POEA). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos, para um mesmo período de tempo ($p < 0,05$).



Valores significativamente menores de RBC e hemoglobina foram observados nos animais pré expostos ao surfactante e submetidos ao estresse aéreo, para o todos os períodos avaliados, t0 ($p = 0,047$ e $p = 0,007$), t1 ($p = 0,008$ e $p = 0,03$), t3 ($p = 0,002$ para ambos) e t6 ($p = 0,048$ e $p = 0,035$), quando comparados aos peixes submetidos apenas ao estresse aéreo (Figura 27). No caso do hematócrito esta diferença foi observada apenas para t0 ($p = 0,037$).

Figura 27 – Valores (média \pm EP, N= 5-10) de hemoglobina (A), RBC (B) e hematócrito (C) de *Prochilodus lineatus* de diferentes grupos experimentais (CTR, POEA, Estresse e POEA + Estresse) amostrados imediatamente (0) ou após 1, 3 e 6 h da exposição aérea (Estresse e POEA + Estresse) ou apenas da transferência de aquários (CTR e POEA). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos, para um mesmo período de tempo ($p < 0,05$).



5.2.3 Exposição ao POEA

Nos animais somente expostos ao surfactante POEA, ou seja, grupo POEA, não foram observadas alterações significativas nas concentrações plasmáticas de cortisol (Figura 24A) e glicose (Figura 24B) para todos os períodos avaliados, (t_0 , $p = 0,422$; $p = 0,100$; t_1 , $p = 0,237$; $p = 0,592$; t_3 , $p = 0,230$; $p = 0,210$ e t_6 , $p = 0,538$; $p = 0,070$, respectivamente) quando comparados aos respectivos grupos Controle.

As concentrações plasmáticas dos íons sódio (Figura 24A) e cloreto (Figura 25B), assim como a atividade branquial da enzima Na^+/K^+ -ATPase (Figura 26) permaneceram inalteradas nos animais do grupo POEA para todos os períodos avaliados (t0, p = 0,355; p = 0,194; p = 0,937; t1, p = 0,577; p = 0,515; p = 0,198; t3, p = 0,092; p = 0,780; p = 0,064 e t6, p = 0,267; p = 0,859; p = 0,207, respectivamente) quando comparados aos animais dos respectivos grupos Controle.

Valores significativamente menores de RBC e hemoglobina foram observados nos animais somente expostos ao surfactante, para o todos os períodos avaliados, t0 (p = 0,002 e p = 0,010), t1 (p = 0,001 e p = 0,020), t3 (p = 0,003 e p = 0,002) e t6 (p = 0,008 e p = 0,040), quando comparados aos peixes do grupo Controle (Figura 27). Para os valores de hematócrito não foi observada nenhuma diferença significativa nos animais expostos ao surfactante, grupo POEA em relação aos animais do grupo Controle para todos os tempos avaliados (t0, p = 0,387; t1, p = 0,472; t3, p = 0,616 e t6 p = 0,783).

5.3 DISCUSSÃO

A resposta de estresse em peixes tem sido uma ferramenta amplamente empregada na compreensão da biologia de diferentes espécies (Barreto e Volpato, 2006; Mariano et al., 2009) e também na avaliação da interferência de contaminantes ambientais, tais como os herbicidas (Cericato et al., 2008; Nascimento et al., 2012), metais (Sandhu e Vijayan, 2011; Nascimento et al., 2012) e outros compostos orgânico, entre eles surfactantes alquilfenóis e seus metabólitos (Shioda e Wakabayashi, 2000; Routledge e Sumpter, 2009) sobre tal resposta.

Em peixes, agentes estressores agudos induzem uma resposta de estresse complexa, a qual é coordenada pelo cérebro e mediada pela ativação do eixo hipotálamo – sistema nervoso autônomo – células cromafins (HSC) com liberação de catecolaminas, adrenalina em particular pelas células cromafins e eixo hipotálamo – hipófise – células interrenais (HPI) com a liberação do cortisol pelas células interrenais (Barton, 2002). Os efeitos da adrenalina na resposta de estresse estão diretamente relacionados ao fornecimento de energia, caracterizando uma ação imediata dirigida para a sobrevivência do organismo o que é suportado posteriormente pela ação do cortisol (Wendelaar Bonga, 1997). No presente estudo, foi observado nos animais do grupo Estresse o aumento da glicemia plasmática imediatamente após a aplicação do estímulo estressor. Este aumento na concentração plasmática de glicose em t0 pode ser atribuído à ativação do eixo HSC, com a posterior liberação de catecolaminas pelas células cromafins (Barton, 2002). Estressores tais como o manuseio e a hipóxia têm sido frequentemente apontados na literatura como causadores de um rápido aumento na glicose plasmática, e assim como sugerido neste trabalho, este efeito hiperglicêmico está associado com a ativação do eixo HSC e liberação de catecolaminas pelas células cromafins de peixes teleósteos (Barton e Iwama, 1991; Nascimento et al., 2012). Portanto, o aumento da concentração plasmática de glicose apresentado em t0 pode ser considerado um indicador da ativação simpática durante o estresse

(Arends et al., 1999). Outra evidência da ativação do eixo HSC e liberação de catecolaminas se deve ao fato de que a adrenalina está provavelmente relacionada ao aumento no número de eritrócitos (RBC) circulantes observado no período de t0. A adrenalina induz a liberação de eritrócitos imaturos na circulação pela contração do baço, este mecanismo é tido como uma resposta rápida do animal à condição de estresse agudo induzido pela hipóxia, e o aumento do RBC visa o aumentar na capacidade de transporte de oxigênio (Moura et al., 1997). Dados da literatura relacionam diretamente o aumento do hematócrito e da concentração de hemoglobina com a elevação no número de eritrócitos circulantes (Soldatov, 1996; Mariano et al., 2009), deste modo, no presente estudo pode-se sugerir que, tanto o aumento do hematócrito, quanto do conteúdo de hemoglobina, observados em t0 nos animais pertencentes ao grupo Estresse estão diretamente relacionados ao maior número de eritrócitos circulantes encontrados nestes animais.

A elevação dos níveis plasmáticos de cortisol é um indicador clássico para a detecção de estresse em peixes e se mostra sensível a uma ampla variedade de estímulos estressores tais como manipulação (Carneiro e Urbinati, 2001; Gomes et al., 2003; Brandão et al., 2006), alteração da temperatura (Lima et al., 2006) e pH da água (Ghanbari et al., 2012), exposição a metais (Sandhu e Vijayan, 2011; Nascimento et al., 2012), poluentes orgânicos (Cericato et al., 2008; Nascimento et al., 2012) e estresse aéreo (Nascimento et al., 2012). Sabe-se que a elevação nos níveis de cortisol plasmático diante da exposição de peixes a estressores agudos é transitória e que durante o período de recuperação a concentração deste hormônio retorna a seus valores basais. No presente estudo, a ativação da resposta de estresse em *P. lineatus* submetidos ao estresse aéreo pode ser indicada pelo aumento dos níveis de cortisol plasmático nos tempos de 1 e 3 horas após o estímulo estressor, sendo os valores basais restabelecidos após 6 h. Estes dados corroboram os resultados de Nascimento e colaboradores (2012), que observaram que a exposição da mesma espécie de peixe ao mesmo delineamento experimental também elevou os níveis de cortisol nos tempos de 1 e 3 h, os quais também foram restabelecidos após 6 horas. O cortisol é frequentemente utilizado como um indicador de estresse (Cericato et al., 2008; Simonato et al., 2008; Nascimento et al., 2012) e possui um amplo leque de efeitos em peixes, sendo brânquias, intestino e fígado alvos importantes, os quais refletem suas duas maiores ações: controle do balanço energético e hidromineral (Wendelaar Bonga, 1997). Quanto ao efeito do cortisol no balanço energético, o aumento na glicemia plasmática frente a um agente estressor indica uma estratégia do organismo adotada para lidar com uma demanda de energia prolongada durante a situação de estresse, desta forma o cortisol desempenha papel importante na mobilização de glicose por meio da glicogenólise hepática e indução de enzimas chaves pela gliconeogênese (Vijayan et al., 1997). Desta forma, a elevação da glicemia, observada nos tempos de 1 e 3 h após a aplicação do estímulo estressor, pode estar diretamente associada ao aumento na concentração plasmática de cortisol nos animais submetidos somente ao estresse aéreo.

No presente estudo foi observada a diminuição da atividade branquial da NKA, juntamente com a redução do Na⁺ plasmático, nos grupos de peixes submetidos ao estresse aéreo e

amostrados imediatamente. Diante destes resultados é possível apontar a sensibilidade da enzima NKA à presença de agentes estressores (Imsland et al., 2003) e o importante papel que esta enzima exerce na regulação iônica em peixes (Huang et al., 2010), uma vez que a diminuição em sua atividade parece estar diretamente relacionada à menor concentração do íon sódio. Dados da literatura apontam que peixes em condições de hipóxia promovem ajustes fisiológicos associados à tentativa de maior absorção de O₂. No entanto, tais ajustes possuem um efeito negativo sobre a regulação iônica dos peixes, sendo responsabilizados por uma diminuição de pelo menos 10% da concentração plasmática do sódio, que é reestabelecida após a condição de hipóxia (Matey et al., 2008). Desta forma, no presente estudo é evidente que em peixes do grupo Estresse a partir do tempo t1 os animais apresentaram concentrações iônicas semelhantes aos animais do grupo controle. Este efeito nos tempos de 1 e 3 horas após a aplicação do estímulo estressor aponta um importante papel do cortisol no balanço hidromineral.

Quanto à avaliação da interferência do POEA sobre a resposta de estresse de *P. lineatus*, é possível apontar que o surfactante promove a inibição desta resposta. Os valores de cortisol e glicose plasmáticos dos animais pré-expostos ao surfactante permaneceram inalterados para qualquer período após a aplicação do estímulo estressor. Diante destes resultados sugere-se que a resposta de estresse destes animais está inibida nos eixos HSC e HPI. A ativação do eixo HSC observada nos animais do grupo Estresse no tempo de t0 resultou em aumento da concentração plasmática de glicose e dos parâmetros hematológicos. Estes efeitos não foram observados nos animais pré-expostos ao surfactante no mesmo período, o que indica que o POEA pode exercer efeito inibitório sobre a resposta simpática observada pela ativação do eixo HSC. Quanto ao efeito do POEA sobre o eixo HPI, os resultados do presente trabalho sugerem que o surfactante exerce efeito inibitório sobre a liberação do cortisol, porém ainda não é possível afirmar em qual nível do eixo que o POEA pode atuar. Dados na literatura já apontaram a capacidade do herbicida à base de glifosato, Roundup[®], em atuar como desregulador endócrino para a espécie de peixe *Rhamdia quelen* (Soso et al., 2007; Cericato et al., 2008). E segundo os dados de Cericato e colaboradores (2009), o efeito de inibição de liberação de cortisol em peixes expostos a este herbicida não está relacionado com a produção e/ou liberação de cortisol pelas células interrenais, o que sugere que a concentração diminuída do hormônio de estresse cortisol esteja relacionada com níveis mais elevados do eixo HPI, ou seja, hipotálamo e/ou hipófise. Contudo, baseado no presente estudo pode-se supor que a atuação do herbicida como desregulador endócrino pode estar relacionado à presença do surfactante na formulação comercializada e que provavelmente o POEA pode estar atuando em níveis mais elevados do eixo HPI.

Para a análise dos parâmetros hematológicos de peixes pré-expostos ao surfactante e submetidos ao estresse aéreo é bem evidente que a exposição ao surfactante promove a diminuição do número de células sanguíneas e concentração de hemoglobina para todos os períodos avaliados. Este resultado pode ser bem sustentado pelos dados obtidos no capítulo 4 deste trabalho, onde a exposição dos peixes a qualquer uma das concentrações analisadas de POEA promoveu diminuição no

número de eritrócitos circulantes, o que sugere que o surfactante promove hemólise de eritrócitos com consequente diminuição do conteúdo de hemoglobina. Esta ideia pode ser reforçada no presente estudo, pois os animais somente expostos ao surfactante, ou seja, o grupo POEA assim como os peixes do grupo POEA + Estresse também apresentaram diminuição do RBC e hemoglobina. Desta forma, baseado nos dados apresentados anteriormente (Cap. 4) e no presente trabalho (Cap. 5) é possível sustentar a capacidade que o surfactante possui em promover a hemólise de eritrócitos e bloquear a resposta simpática de estresse (eixo HSC), sem que ocorra a liberação de eritrócitos imaturos na circulação em peixes submetidos à exposição aérea.

Nos animais pertencentes ao grupo POEA + Estresse também pode ser observada a diminuição da atividade enzimática branquial da NKA e da concentração do sódio, assim como nos animais somente submetidos ao Estresse aéreo. Porém ao analisar os mesmos parâmetros para o tempo t1 nos animais submetidos ao estresse e expostos ao surfactante é possível notar que tanto a NKA quanto a concentração plasmática de sódio permaneceram diminuídos, o que reforça a hipótese de que o surfactante pode retardar a restauração do equilíbrio iônico dos organismos após um estímulo estressor adicional.

Em conclusão, estes resultados indicam claramente que o POEA prejudica a resposta de estresse do peixe *P. lineatus* impedindo um aumento de cortisol plasmático e que os peixes expostos ao POEA não são capazes de responder a um estresse adicional.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho, o capítulo 4 teve como objetivo avaliar a toxicidade do surfactante POEA para a espécie de peixe neotropical *P. lineatus* em diferentes níveis organizacionais: bioquímicos, genéticos e fisiológicos. Após a determinação do potencial toxicológico do surfactante, o capítulo 5 avaliou a interferência que o POEA exerce sobre a resposta de estresse do peixe *P. lineatus*.

Na avaliação dos efeitos tóxicos do surfactante, os resultados mostraram que o POEA promoveu a ativação indireta da via de biotransformação de fase I. Diante deste resultado surge uma lacuna importante quanto a falta de informações das possíveis vias de metabolização do surfactante e, conseqüentemente os metabólitos produzidos durante este processo. Baseado no presente estudo pode-se sugerir que durante o processo de biotransformação do POEA ocorre a formação de produtos pró-oxidantes, os quais estão diretamente relacionados à inibição da fase II do processo de biotransformação, o qual é indicado pela diminuição da atividade hepática da enzima GST. Quanto à avaliação da resposta antioxidante, os resultados apontam que o POEA foi capaz de ativar as defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimática, provavelmente a fim de eliminar o excesso de ERO geradas no processo de detoxificação, ou mesmo como efeito do próprio surfactante. No entanto, a ativação das defesas antioxidantes não foi suficiente para impedir danos oxidativos nas membranas nos animais expostos à menor concentração avaliada. Para a análise de danos no DNA dos eritrócitos, os resultados apontam que o POEA se apresentou genotóxico para *P. lineatus* em qualquer uma das concentrações analisadas. Diante dos resultados é possível apontar indícios do aumento na geração de produtos pró-oxidantes, no entanto não foi possível definir a origem dos danos observados no DNA, desta forma ainda são necessários estudos para analisar a origem do potencial genotóxico do POEA. A avaliação dos efeitos tóxicos do POEA em parâmetros fisiológicos apontou para um efeito do surfactante na liberação de cortisol. Os resultados obtidos com os animais expostos à maior concentração indicaram a inibição da liberação do cortisol e efeitos hiperglicêmicos. Estes resultados levam a formulação da hipótese de que o POEA atua como desregulador endócrino. Nos parâmetros hematológicos os resultados apontam a capacidade do POEA em promover hemólise de eritrócitos e conseqüentemente acarretar em situação de hipóxia. Em conjunto, o presente estudo mostra claramente os efeitos do POEA em diferentes níveis organizacionais, e que tais efeitos como: diminuição na atividade da enzima hepática GST, peroxidação lipídica, danos ao DNA e hemólise resultam do aumento na geração de produtos oxidantes e conseqüentemente um desequilíbrio no estado redox do peixe.

Os resultados apresentados no capítulo 5 confirmaram a hipótese de que o POEA atua como desregulador endócrino. Esta confirmação está baseada na inibição de liberação do cortisol apresentada nos animais pré-expostos ao surfactante e submetidos ao estresse aéreo. Os resultados sugerem que o POEA pode também atuar sobre a ativação do eixo HSC, promovendo inibição da resposta adrenérgica. No entanto, esta afirmação não pode ser sustentada baseada nos dados obtidos no

presente estudo, desta forma, mais estudos são necessários para a compreensão do efeito do POEA sobre o eixo HSC. Diante dos resultados apresentados pode ser concluído que houve variações dos parâmetros estudados nos animais expostos ao surfactante em relação a aqueles somente submetidos à situação de estresse, no entanto mais estudos são necessários para a compreensão da atuação do POEA como desregulador endócrino. O POEA pode ter atuado indiretamente sobre os parâmetros estudados, interferindo na ativação dos eixos HSC e/ou HPI como mencionado anteriormente, ou ainda atuado diretamente através de sua toxicidade sobre diferentes parâmetros analisados.

O conjunto de resultados apresentados neste trabalho reforça a importância da avaliação do potencial tóxico de todos os compostos presentes em formulações de herbicidas, visto que baixas concentrações do surfactante foram suficientes para promover efeitos tóxicos em *P. lineatus* e serve para alertar toxicologistas ambientais, pois mostra que compostos classificados como “inertes” podem ser potencial fonte de contaminação ambiental. A carência de dados sobre os efeitos do POEA em concentrações subletais faz deste trabalho uma importante fonte de informações sobre seus efeitos, entretanto, ainda mais estudos são necessários a fim de compreender os mecanismos de atuação deste surfactante.

REFERÊNCIAS

- Abrahamson, A., Anderson, C., Jonsson, M.E., Fogelberg, O., Orberg, J., Brunstrom, B., Brandt, I., 2007. Gill EROD in monitoring of CYP1A inducers in fish-A study in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) caged in Stockholm and Uppsala Waters. *Aquat. Toxicol.* 85, 1-8.
- Adams, S.M., Shugart, L.R., Southworth, G.R., Hinton, D.E., 1990. Application of bioindicators in assessing the health of fish populations experiencing contaminant stress. In: McCarthy, J.F., Shugart, L.R. (ed) *Biomarkers of Environmental Contamination*. Boca Raton: Lewis Publishers, p. 333-353.
- Adhikari, S., Sarkar, B., Chatterjee, A., Mahapatra, C.T., Ayyappan, S., 2004. Effects of cypermethrin and carbofuran on certain hematological parameters and prediction of their recovery in a freshwater teleost, *Labeo rohita* (Hamilton). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 58, 220-226.
- Affonso, E.G., Polez, V.L.P., Corre, C.F., Mazon A.F., Araújo, M.R.R., Moraes, G., Rantin, F.T., 2002. Blood parameters and metabolites in the teleost fish *Colossoma macropomum* exposed to sulfide or hypoxia. *Comp. Biochem. Physiol. C* 133, 375-382.
- Ahmad, I., Hamid, T., Fatima, M., Chand, H.S., Jain, S.K., Athar, M., Raisudin, S., 2000. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Biochim. Biophys. Acta* 1523, 37-48.
- Amado, L.L., Garcia, M.L., Ramos, P.B., Freitas, R.F., Zafalorf, B., Ferreira, L.R., Yunes, J.S., Monserrat, J.M., 2009. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. *Sci. Total Environ.* 407, 2115-2123.
- 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.
- ANVISA e UFPR, 2012. Seminário de mercado de agrotóxico e regulação. ANVISA, Brasília, 11 de abril de 2012.
- Arends, R.J., Mancera, J.M., Munoz, J.L., Wendelaar Bonga, S.E., Flik, G., 1999. The stress response of the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) to air exposure and confinement. *J. Endocrinol.* 163, 149-157.
- Arias, A.R.L., Buss, D.F., Albuquerque, C., Inácio, A.F., Freire, M.M., Egler, M., Mugnai, R., Baptista, D.F., 2007. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. *Ciênc. Saúde Colet.* 12, 61-72.
- Arukwe, A., Nordtug, T., Kortner, T.M., Mortensen, A.S., Brakstad, O.G., 2008. Modulation of steroidogenesis and xenobiotic biotransformation responses in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to water-soluble fraction of crude oil. *Environ. Res.* 107, 362-370.
- Assis, H.C.S., Nicareta, L., Salvo, L.M., Klemz, C., Truppel, J.H., Calegari, R., 2009. Biochemical biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Ancistrus multispinis*. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 52, 1401-1407.
- Bagnyukova, T.V., Chahrak, O.I., Lushchak, V.I., 2006. Coordinated response of goldfish antioxidant defenses to environmental stress. *Aquat. Toxicol.* 78, 325-331.
- Barreiros, A.L.B.S., David, J.M., 2006. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quím. Nova* 29, 113-123.

- Barreto, R.E., Volpato, G.L., 2006. Stress responses of the fish Nile tilapia subjected to electroshock and social stressors. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 39, 1605-1612.
- Barton, B.A., Iwana, G.K., 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annu. Rev. Fish Disease* 3-26.
- Barton, B.A., 2002. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integ. Comp. Biol.* 42, 517-525.
- Batista, M. T. A., Rodrigues, H. G., Fonseca, L. C., Bonetti, A. M., Penha-Silva, N., Neres, A. C., Aversi-Ferreira, T. A., 2007. Estudo dos efeitos do pesticida da classe glicina substituída sobre eritrócitos humanos. *Rev. Eletrônica de Farmácia* 3, 22- 24.
- Beutler, E., Duron, O., Kelly, B.M., 1963. Improved method for the determination of blood glutathione. *J. Lab. Clin. Med.* 61, 882-888.
- Beutler, E., 1975. *Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods*. Grune and Stratton, New York.
- Beyer, J., Sandvik, M., Hylland, K., Field, E., Egaas, E., Aas, E., Skaare, J.U., Goksoyr, A., 1996. Contaminant accumulation and biomarker response in flounder (*Platichthys flexus* L.) and Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) exposed by caging to polluted sediment in Sorfjorden, Norway. *Aquat. Toxicol.* 36, 75-98.
- Bjelland, S., Seeberg, E., 2003. Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. *Mutat. Res.* 531, 37-80.
- Bloom, J.C., Brandt, J.T., 2008. Toxic response of blood. In: Casarett, L.J., Klaassen, C.D., Casarett and Doull's, *Toxicology: The Basic Science of Poisons*, 7^a ed. McGraw-Hill Medical, New York, 455-484.
- Brandão, F.R., Gomes, L.C., Chagas, E.C., 2006. Resposta de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura. *Acta Amazon.* 36, 349-356.
- Breen, A.P., Murphy, J.A., 1995. Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radical Bio. Med.* 18, 1033-1077.
- Cajaraville, M.P., Bebbiano, M.J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A., 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci. Total Environ.* 247, 295-311.
- Camargo, M.M.P., Fernandes, M.N., Martinez, C.B.R., 2009. How aluminium exposure promotes osmoregulatory disturbances in the neotropical freshwater fish *Prochilus lineatus*. *Aquat. Toxicol.* 94, 40-46.
- Cannas, M., Atzori, F., Rupsard, F., Bustamante, P., Loizeau, V., Lefrançois, C., 2012. PCBs contamination does not alter aerobic metabolism and tolerance to hypoxia of juvenile sole (*Solea solea* L. 1758). *Aquat. Toxicol.* 127, 54-60.
- Carlberg, I., Mannervik, B., 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 250, 5475-5480.
- Carletti, E., Sulpizio, M., Bucciarellia, T., Boccia, P.D., Federicia, L., Ilioa, C.D., 2008. Glutathione transferases from *Anguilla anguilla* liver: identification, cloning and functional characterization. *Aquat. Toxicol.* 90, 48-57.

- Carneiro, F.F., Pignati, W., Rigotto, R.M., Augusto, L.G.S., Rizollo, A., Muller, N.M., Alexandre, V.P., Friedrich, K., Mello, M.S.C., 2012. Dossiê Abrasco: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Rio de Janeiro: Abrasco, abr. 2012 (1ª Parte). Disponível em: <http://www.abrasco.org.br/UserFiles/File/ABRASCODIVULGA/2012/DossieAGT.pdf>. Acesso em: 04 dez. 2012.
- Carneiro, P.C.F., Urbinati, E.C., 2001. Salt as a stress response mitigator of matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther), during transport. *Aquac. Res.* 32, 298-307.
- Carvalho, C.S., Fernandes, M.N., 2008. Effect of cooper on liver key enzymes of anaerobic glucose metabolism from freshwater tropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 151, 437-442.
- Castro, R.M.C., Vari, R.P., 2003. Check list of the freshwater fishes of South and central America. Family Prochilodontidae. Porto Alegre: EDIPUCRS., 71-84.
- Castro, V.L.S.S., 2004. Aspectos da exposição ambiental aos agroquímicos no desenvolvimento animal. *Cadernos de Ciência e Tecnologia* 21, 469-497.
- Cavalcante, D.G.S.M., Martinez, C.B.R., Sofia, S.H., 2008. Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutat. Res.* 655, 41-46.
- Cericato, L., Neto, J.G.M., Fagundes, M., Kreutz, L.C., Quevedo, R.M., Finco, J., Rosa, J.G.S., Koakoshi, G., Centenaro, L., Pottker, E., Anziliero, D., Barcellos, L.J.G., 2008. Cortisol response to acute stress in jundiá *Rhamdia quelen* acutely exposed to sub-lethal concentrations of agrichemicals. *Comp. Biochem. Physiol. C* 148, 281-286.
- Cericato, L., Neto, J.G.M., Kreutz, L.C., Quevedo, R.M., Rosa, J.G.S., Koakoshi, G., Centenaro, L., Pottker, E., Marqueze, A., Barcellos, L.J.G., 2009. Responsiveness of the interrenal tissue of Jundiá (*Rhamdia quelen*) to an in vivo ACTH test following acute exposure to sublethal concentrations of agrichemicals. *Comp. Biochem. Physiol. C* 149, 363-367.
- CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente/ Ministério do Meio Ambiente. Resolução nº 357 de 17 de março de 2005.
- Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M., Joseph, L., 2003. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB J.* 17, 1195-1214.
- Copatti, C.E., Garcia, L.O., Baldisserotto, B., 2009. Uma importante revisão sobre o impacto de agroquímicos da cultura de arroz em peixes. *Biota Neotrop.* 9, 235-242.
- Delgado, I. F., Paumgartten, F. J. R., 2004. Intoxicações e usos de pesticidas por agricultores do Município de Paty do Alferes, Rio de Janeiro, Brasil. *Cad. Saúde Pública* 20, 180-185.
- Devendra, R., Umamahesh, V., Ramachandra, P., Prasad, T., Asha, S., Ashok., 2004. Influence of surfactants on efficacy of diferente herbicides in controlo of *Cyperus rotundus* and *Oxalis latifolia*. *Current Sci.* 86, 1148-1151.
- Diamond G., Durkin, P., 1997. Effects of Surfactants on the Toxicity of Glyphosate, with Specific Reference to Rodeo. Prepared under USDA FS Contract No. 53-3187-5-12. Final Report. February 6, 1997.
- Di Giulio, R.T., Benson W.H., Sanders B.M., Van Veld P.A., 1995. Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation and toxicity. In: Rand G.M. (ed) *Fundamentals of aquatic toxicology*, 2ª ed. Taylor and Francis, Washington, 523-561.

- Di Giulio, R.T., Hinton, D.E., 2008. The toxicology of fishes. Taylor e Francis, p. 1071.
- Dores, E. F. G. C., De-Lamonica-Freire, E. M., 2001. Contaminação de ambiente aquático por pesticidas. Estudo de caso: Águas usadas para consumo humano em Primavera do Leste, Mato Grosso – Análise preliminar. *Quim. Nova* 24, 27-36.
- Ducar, J., Tredaway, Macdonald, G., 2003. Adjuvants. Series of agronomy department, University of Florida. Abril, 2003, p. 5.
- EC – (European Commission), 2002. Report for the Active Substance Glyphosate. Directive 6511/VI/99, Jan.21. International Programme on Chemical Safety. Glyphosate. Disponível em http://europa.eu.int/comm/food/fs/ph_ps/pro/eva/existing/list1_glyphosate_en.pdf
- Eggens, M. L., Galgani, F., Klungøyr, J., Everts, J., 1992. Hepatic EROD activity in dab, *Limanda limanda*, in the German Bight using an improved plate-reader method. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 91, 71-75.
- EPA (United States Environmental Protection Agency), 1993. Reregistration eligibility decision: glyphosate. Disponível em http://www.epa.gov/opsrrd1/REDs/old_reds/glyphosate.pdf
- Evans, D.H., Piermarini, P.M., Choe, K.P., 2005. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiol. Rev.* 85, 97-177.
- Evans, D. H., 2008. Teleost fish osmoregulation: what have we learned since August Krogh, Homer Smith, and Ancel Keys. *Am. J. Physiol. - Reg. Integr. Comp. Physiol.* 295, 704–713.
- Fendler, E.J., Day, C.L., Fendler, J. H., 1972. Proton magnetic resonance investigation of environment of aromatic compounds in aqueous zwitterionic micellar solutions. *J. Phys. Chem.* 76, 1460-1466.
- Foy, C., 1987. Adjuvants: terminology, classification, and mode of action. In: *Adjuvants and agrochemicals*, CRC Press, Boca Raton.
- Foy, C.L., 1996. Adjuvants - current technology and trends. In: Foy, C.L., Pritchard, D.W. (eds.), *Pesticide Formulation and Adjuvant Technology*. CRC Press, Boca Raton, FL, 323–352.
- Frenzilli, G., Scarcelli, V., Del Barga, I., Nigro, M., Forlin, L., Bolognesi, C., Sturve, J., 2004. DNA damage in eelpout (*Zoarces viviparus*) from Goteborg harbor. *Mut. Res.* 552, 187–195.
- Garcia, C.Z., Martinez, C.B.R., 2012. Biochemical and genetic alterations in the freshwater neotropical fish *Prochilodus lineatus* after acute exposure to *Microcystis aeruginosa*. *Neotrop. Ichthyol.* 10, 613-622.
- Ghambari, M., Jami, M., Domig, K.J., Kneifel, W., 2012. Long-term effects of water pH changes on hematological parameters in the common carp (*Cyprinus carpio* L.) *Afr. J. Biotechnol.* 11, 3153-3159.
- Ghisi, N.C., Cestari, M.M., 2012. Genotoxic effects of the herbicide Roundup in fish *Corydoras paleatus* (Jenyns 1842) after short-term, environmentally low concentration exposure. *Environ Monit Assess.* DOI 10.1007/s10661-012-2783-x.
- Giesy, J.P., Dobson, S., Solomon, K.R., 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide. *Rev. 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., Simões, 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. C* 146, 519-524.
- Gomes, L.C., Araujo-Lima, C.A.R.M., Roubach, R., Chippari-Gomes, A.R., Lopes, N.P., 2003. Effect of fish density during transportation on stress and mortality of juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. *J. World Aquacult. Soc.* 34, 76-84.
- Gonzalez, R.J., Wilson, R.W., Wood, C.M., 2006. Ion regulation in tropical fishes from ion-poor, acidic blackwaters: In Val, A.L., Almeida Val, V.M., Randall, D.J. (Ed.). *The Physiology of Tropical Fishes*. Academic Press. 396-442.
- Guilherme, S., Gaivão, I., Santos, M.A., Pacheco, M., 2010. European eel (*Anguilla anguilla*) genotoxic and pro-oxidant responses following short-term exposure to Roundup: a glyphosate-based herbicide. *Mutagenesis* 25, 523-530.
- Guilherme, S., Santos, M.A., Gaivão, I., Barroso, C., Pacheco, M., 2012a. Differential genotoxicity of Roundup formulation and its constituents in blood cells of fish (*Anguilla anguilla*): considerations on chemical interactions and DNA damaging mechanisms. *Ecotoxicology* 21, 1381-1390.
- Guilherme, S., Gaivão, I., Santos, M.A., Pacheco, M., 2012b. DNA damage in fish (*Anguilla anguilla*) exposed to a glyphosate-based herbicide – Elucidation of organ-specificity and the role of oxidative stress. *Mutat. Res.* 743, 1-9.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C, 2005. *Free radicals in biology and medicine*, 3^a ed. Clarendon Press, Oxford.
- Health Canada, 1991. Discussion Document. Pre-harvest use of glyphosate. D91-01. Disponível em http://www.hc-sc.gc.ca/pmra-arla/english/pdf/prdd/prdd_d9101-e.pdf.
- Heath, A.G., 1995. *Water Pollution and Fish Physiology*, 2^a ed. Lewis Publishers, Boca Raton.
- Herbert, N.A., Steffensen, J.F., 2005. The response of Atlantic cod, *Gadus morhua*, to progressive hypoxia: fish swimming speed and physiological stress. *Mar. Biol.* 147, 1403-1412.
- Hermes Lima, M., Storey, K.B., 1993. *In vitro* oxidative inactivation of glutathione S transferase from a freeze tolerant reptile. *Mol. Cell. Biochem.* 124, 149–158.
- Hermes Lima, M., Storey, J., M., Storey, K., B., 2001. Antioxidant defense and animal adaptation to oxygen availability during environmental stress. In: Storey, K.B., Storey, J.M. (eds) *Cell and Molecular Response to Stress*, vol 2, Elsevier, Amsterdam, 263-287.
- Hermes Lima, M., 2004. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: Storey KB (ed) *Functional metabolism: regulation and adaptation*. Wiley-Liss, Hoboken, 319-368.
- Hodgson, E., Das, P.C., Cho, T.M., Rose, R.L., 2008. Phase I metabolism of toxicants and metabolic interactions. In: Smart, R.C., Hodgson, E. (eds) *Molecular and biochemical toxicology* 4^a ed. John Wiley & Sons, New Jersey, p. 173-204.
- Holeton, G.F., Randall, D.J., 1967. The effect of hypoxia upon the partial pressure of gases in the blood and water afferent and efferent to the gills of rainbow trout. *J. Exp. Biol.* 46, 317-327.
- 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.
- Huang, C.Y., Chao, P.L., Lin, H.C., 2010. Na⁺/K⁺-ATPase and vacuolar-type H⁺-ATPase in the gills of the aquatic air-breathing fish *Trichogaster microlepis* in response to salinity variation. *Comp. Biochem. Physiol. A* 155, 309–318.
- IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis), 2010. Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: Uma abordagem ambiental. Rebelo, R.F., Vasconcelos, R.A., Buys, B.D.M.C., Rezende, J.A., Morais, K.O.C., Oliveira, R.P. Brasília. IBAMA.
- Imsland, A.K., Gunnarsson, S., Foss, A., Stefansson, S.O., 2003. Gill Na⁺, K⁺-ATPase activity, plasma chloride and osmolality in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) reared at different temperatures and salinities. *Aquaculture* 218, 671-683.
- Jiang, Z.Y., Woollard, A.C.S., Wolf, S., 1991. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange—comparison with TBA assay and on iodometric method. *Lipids* 26, 853-856.
- 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.
- Kienzler, A., Tronchère, X., Devaux, A., Bory, S., 2012. Assessment of RTG-W1, RTL-W1, and PLHC-1 fish cell lines for genotoxicity testing of environmental pollutants by means of a Fpg-modified comet assay. *Toxicol. In Vitro.* 26, 500-510.
- Koakoski, G., Abreu, M.S., Cruz, C., Silva, D.R., Carraschi, S.P., Kreutz, L.C., Barcellos, L.J.G., 2013. Cortisol response in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L., following acute exposure to a glyphosate-based herbicide. *Environ. Sci.* 1, 25-32.
- Kobayashi, H., Suguyama, C., Morikawa, Y., Hayashi, M., Sofuni, T., 1995. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis. *MMS Commun.* 3, 103-115.
- Krogh, K.A., Halling-Sorensen, B., Mogensen, B.B., Vejrup, K.V., 2003. Environmental properties and effects of nonionic surfactant adjuvants in pesticides: a review. *Chemosphere* 50, 871-901.
- Lajmanovich, R.C., Attademo, A.M., Peltzer, P.M., Junges, C.M., Cabana, M.C., 2010. Toxicity of four herbicide formulations with glyphosate on *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) tadpoles: B-esterases and glutathione-S-transferase inhibitors. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 60, 681-689.
- Lam, P.K.S., 2009. Use of biomarkers in environmental monitoring. *Ocean Coast. Manage.* 52, 348–354.
- 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. C* 147, 222-231.
- Leonhardt, J.H., Frossard, H., Filho, M.C., 2002. Piscicultura. In: Medri, M.E. et al. (eds). A bacia do rio Tibagi. Londrina: Edição dos editores, 551-577.
- Lima, E.S., Abdalla, D.S.P., 2001. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 37, 293-303.
- Lima, L.C., Ribeiro, L.P., Leite, R.C., Melo, D.C., 2006. Estresse em peixes. *Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte*, 30, 113-117.

- Lingwood, D., Harauz, G., Ballantyne, J.S., 2006. Decoupling the Na⁺/K⁺/ATPase in vivo: A possible new role in the gills of freshwater fishes. *Comp. Biochem. Physiol. A* 144, 541-457.
- 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.
- Lushchak, O.V., Kubrak, O.I., Storey, J.M., Storey, K.B., Lushchak, V.I., 2009. Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. *Chemosphere* 76, 932-937.
- Lushchak, V. I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 101, 13-30.
- Mackenzie, E.L., 2008. Reactive oxygen/reactive metabolites and toxicity. In: Smart, R.C., Hodgson, E. (eds) *Molecular and Biochemical Toxicology 4^a ed.* John Wiley & Sons, New Jersey, 389-412.
- Madsen, T., Buchardt, H., Nylén, D., Rathmann, A., Petersen, G., Simonsen, F., 2001. Environmental and health assessment of substances in household detergents and cosmetic detergents products. *Cetox Environmental Project n° 615.*
- Mariano, W.S., Oba, E.T., Santos, L.R.B., Fernandes, M.N., 2009. Physiological responses in jeju (*Hoplerythrinus unitaeniatus*) to atmospheric air exposure. *Rev. Bras. Saúde Prod.* 10, 210-223
- Marshall, W. S., Bryson, S. E., 1998. Transport mechanisms of seawater chloride cells: An inclusive model of a multifunctional cell. *Comp. Biochem. Physiol. A* 119, 97-106.
- Martinez, T.T., Brown, K., 1991. Oral and pulmonary toxicology of the surfactant used in Roundup herbicide. *Proc. Western Pharmacol. Soc.* 34, 43-46.
- Martinez, C.B.R., 2006. Parâmetros bioquímicos de peixes para avaliação da qualidade da água. In: Angela Teresa Silva-Souza. (org.). *Sanidade de Organismos Aquáticos no Brasil.* Maringá: ARAPOA, 43-62.
- Martinez, C.B.R., Cólus, I.M.S., 2002. Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi. In: MEDRI, M.E et al. (eds). *A bacia do rio Tibagi.* Londrina: Edição dos editores, 551-577.
- Martinez, C.B.R., Souza, M.M., 2002. Acute effects of nitrite on ion regulation in two neotropical fish species. *Comp. Biochem. Physiol. A* 133, 151-160.
- Martinez, C.B.R., Nagae, M.Y., Zaia, C.T.B.V., Zaia, D.A.M., 2004. Acute morphological and physiological effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Brazilian J. Biol.* 64, 797-807.
- Matey, V., Richards, J.G., Wang, Y., Wood, C.M., Rogers, J., Davies, R., Murray, B.W., Chen, X.Q., Du, J., Brauner, C.J., 2008. The effect of hypoxia on gill morphology and ionoregulatory status in the Lake Qinghai scaleless carp, *Gymnocypris przewalskii*. *J. Exp. Biol.* 211, 1063-1074.
- McCord, J.E., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase an enzymatic function for erythrocyte hemocuprein. *J. Biol. Chem.* 244, 6049-6055.
- McDonald, G., Milligan, C.L., 1997. Ionic, osmotic and acid-base regulation in stress. In: Iwama, G.W.; Pickering, A.D.; Sumpter, J.P.; Schreck, C.B. (eds.). *Fish stress and health in aquaculture.* Cambridge: University Press, p. 119-144.

- Menezes, C.C., Fonseca, M.B., Loro, V.L., Santi, A., Cattaneo, R., Clasen, B., Pretto, A., Morsch, V.M., 2011. Roundup Effects on Oxidative Stress Parameters and Recovery Pattern of *Rhamdia quelen*. Arch Environ Contam Toxicol. 60, 665-671.
- Mezzanotte, V., Bolzacchini, E., Orlandi, M., Rozzi, A., Rullo, S., 2002. Anaerobic removal of linear alcohol ethoxylates. Bioresour Technol. 82, 151-156.
- Modesto, K.A., Martinez, C.B.R., 2010a. Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. Chemosphere 81, 781-787.
- Modesto, K.A., Martinez, C.B.R., 2010b. Roundup causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. Chemosphere 78, 294-299.
- Mommsen, T.P., Vijayan, M.M., Moon, T.W., 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. Rev. Fish Biol. Fish. 9, 211-268.
- Moura, M. A. F., Oliveira, M. I. S., Val, A. L., 1997. Effects of hypoxia on leucocytes of two Amazon fish *Colossoma macropomum* and *Hoplosternum littorale*. Revista Universidade do Amazonas. Série Ciências Biológicas 1, 13-22.
- Nascimento, C.R.B., 2011. Resposta de estresse no peixe *Prochilodus lineatus* com e sem a interferência do metal cobre e do herbicida atrazina. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual de Londrina, Brasil.
- Nascimento, C.R.B., Souza, M.M., Martinez, C.B.R., 2012. Copper and the herbicide atrazine impair the stress response of the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. Comp. Biochem. Physiol. A 155, 456-461.
- Neskovic, N.K., Poleksic, V., Elezovic, I., Karan, V., Budimir, M., 1996. Biochemical and histopathological effects of glyphosate on carp (*Cyprinus carpio*). Bull. Environ. Contam. Toxicol. 56, 295-302.
- Nitschke, M., Pastore, G.M., 2002. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. Quím. Nova, 25, 772-776.
- Ohe, T., Watanabe, T., Wakabayashi, K., 2004. Mutagens in surface waters: a review. Mutat. Res. 567, 109-149.
- Oropesa, A.L., Garcia-Camero, J.P., Soler, F., 2009. Glutathione and malondialdehyde levels in common carp after exposure to simazine. Environ. Toxicol. Pharmacol. 27, 30-38.
- Oruc, E., 2012. Oxidative stress responses and recovery patterns in the liver of *Oreochromis niloticus* exposed to chlorpyrifos-ethyl. Bull Environ. Contam. Toxicol. 88, 678-684.
- Otto, D.M., Moon, T.W., 1995. 3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl effects on antioxidant enzymes and glutathione status in different tissues of rainbow trout. Pharmacol. Toxicol. 77, 281-287.
- Panepucci, R.A., Panepucci, L., Fernandes, M.N., Sanches, J.R., Rantin, F.T., 2001. The effect of hipóxia and recuperation on carbohydrate metabolism in pacu (*Piaractus mesotamicus*). Braz. J. Biol. 61, 547-554.
- Pankhurst, N.W., 2010. The endocrinology of stress in fish: an environmental perspective. Gen. Comp. Endocrinol. 170, 265-277.
- Parkinson A, Ogilvie B W., 2008. Biotransformation of Xenobiotics. In: Casarett and Doull's-Toxicology: The basic science of poisons (Klaassen CD ed), McGraw-Hill, Inc., New York City, NY.

- Paulino, M.G., Sakuragui, M.M., Fernandes, M.N., 2012. Effects of atrazine on the gill cells and ionic balance in a neotropical fish, *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere* 86, 1-7.
- Quabius, E.S., Balm, P.H.M., Wendelaar Bonga, S.E., 1997. Interrenal stress responsiveness of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) is impaired by dietary exposure to PCB 126. *Gen. Comp. Endocrinol.* 108, 472-482.
- Ramsdorf, W.A., Guimarães, F.S.F., Ferraro, M.V.M., Gabardo, J., Trindade, E.S., Cestari, M.M., 2009. Establishment of experimental conditions for preserving samples of fish blood for analysis with both comet assay and flow cytometry. *Mutat. Res.* 673, 78-81.
- Rand, G.M., 1995. *Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment*, 2^a Ed. Washington: Taylor e Francis.
- Rand, G.M., Petrocelli, S.R., 1985. *Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications*. Washington: Hemisphere Publishing Corporation, p. 666.
- Ribeiro, C.A.O., Neto, F.F., Mela, M., Silva, P.H., Randi, M.A.F., Rabitto, I.S., Costa, J.R.M.A., Pelletier, E., 2006. Hematological findings in neotropical fish *Hoplias malabaricus* exposed to subchronic and dietary doses of methylmercury, inorganic lead, and tributyltin chloride. *Environ. Res.* 101, 74-80.
- Ribeiro, S.M.R., Queiroz, J.H., Pelúzo, M.C.G., Costa, N.M.B., Matta, S.L.P., Queiroz, M.E.L.R., 2005. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. *Biosci. J., Uberlândia*, 21, 133-149.
- Rossi, S.C., Silva, M.D., Piancini, L.D.S., Ribeiro, C.A.O., Cestari, M.M., Assis, H.C.S., 2011. Sublethal Effects of Waterborne Herbicide in Tropical Freshwater Fish. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 87, 603-607.
- Routledge, E., Sumpter, J.P., 2009. Estrogenic activity of surfactants and some their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 241-248.
- Salbego, J., Pretto, A., Gioda, C.R., Menezes, C.C., Lazzari, R., Neto, J.R., Baldisserotto, B., Loro, V.L., 2010. Herbicide Formulation with glyphosate affects growth, acetylcholinesterase activity, and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Arch Environ Contam. Toxicol.* 58, 740-745.
- Sandhu, N., Vijayan, M.M., 2011. Cadmium-mediated disruption of cortisol biosynthesis involves suppression of corticosteroidogenic genes in rainbow trout. *Aquat. Toxicol.* 103, 92-100.
- Sarkar, A., Ray, D., Shrivastava, A., Sarker, S., 2006. Molecular biomarker: their significance and application in marine pollution monitoring. *Ecotoxicology* 15, 333-340.
- Satoh, K., 1978. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin. Chim. Acta* 90, 37-43.
- Schneider, C.D., Oliveira, A.R., 2004. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Rev. Bras. Med. Esporte* 10, 1-6.
- Shibatta, O.A., Gealh, A.M., Bennemann, S.T., 2007. Ictiofauna dos trechos alto e médio da bacia do rio Tibagi, Paraná, Brasil. *Biota Neotrop.* 7, 125-134.
- Shioda, T., Wakabayashi, M., 2000. Effect of certain chemicals on the reproduction of medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* 40, 239-243.

- Silveira, U.S., Logato, P.V.R., Pontes, E.C., 2009. Fatores estressantes em peixes. *Rev. Eletrôn. Nutritime* 6, 1001-1017.
- Simonato, J.D., Fernandes, M.N., Martinez, C.B.R., 2011. Gasoline effects on biotransformation and antioxidant defenses of the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Ecotoxicology* 20, 1400-1410.
- Simonato, J.D., Guedes, C.L.B., Martinez, C.B.R., 2008. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. *Ecotox. Environ. Safe.* 69, 112-120.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A single technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.* 175, 184-191.
- Soldatov, A.A., 1996. The effect of hypoxia on red blood cells of flounder: a morphologic and autoradiographic study. *J. Fish Biol.*, 48, 321-328.
- Soso, A.B., Barcellos, L.J.G., Ranzani-Paiva, M.J., Kreutz, L.C., Quevedo, R.M., Anziliero, D., Lima, M., Silva, L.B., Ritter, F., Bedin, A.C., Finco, J.A., 2007. Chronic exposure to sub-lethal concentration of a glyphosate-based herbicide alters hormone profiles and affects reproduction of female Jundia (*Rhamdia quelen*). *Environ. Toxicol. Phar.* 23, 308-313.
- Stegeman J.J., Brower M., Di Giulio R.T., Fórlin L., Fowler, B.A., Sanders B.M., Van Veld P. A., 1992. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: Hugget, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle, P.P. Jr., Bergman, H.L. Biomarkers biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. Lewis Publishers, Chelsea, 235-335.
- Talmage, S.S., 1994. Environmental and human safety of major surfactants: alcohol ethoxylates and alkylphenol ethoxylates. A Report to the Soap and Detergent Association. Boca Raton, FL' Lewis Publishers.
- Tellis, M.S., Alsop, D., Wood, C.M., 2012. Effects of copper on the acute cortisol response and associated physiology in rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol. C* 155, 281-289.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single Cell Gel/Comet Assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology Testing. *Environ. Mol. Mutagenesis* 35, 206-221.
- Totti, A., Chida, A.Y., Tomita, H.K., Porto, J., Ogura, L.L., Leal, S., 2007. Marcadores de poluição. *Química das Águas. QFL – 3201*. São Paulo.
- 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.
- Tu, M., Randall, J.M., 2003. Adjuvants. In: Tu, M., Hurd, C., Randall, J.M. Weed control methods handbook the nature conservancy. Davis: TNC. p. 1-24.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullas, M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotox. Environ. Safe.* 64, 178-189.
- 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. *Ecotoxicology* 5, 217-225.

- Vijayan, M.M., Pereira, C., Grau, E.G., Iwama, G.K., 1997. Metabolic responses associated with confinement stress in tilapia: the role of cortisol. *Comp. Biochem. Physiol. C* 116, 89–95.
- Wendelaar Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. *Physiol. Rev.* 77, 591-625.
- WHO (World Health Organization), 1994. Glyphosate: environmental health criteria 159. Geneva.
- Whyte J.J., Jung R.E., Schmitt C.J., Tillitt D.E., 2000. Ethoxyresorufin-Odeethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Crit. Rev. Toxicol.* 30, 347-570.
- Willians, G.M., Kroes, R., Munco, C., 2000. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate for humans. *Regul. Toxicol. Pharm.* 31, 17-65.
- Winkaler, E.U., Silva, A.G., Galindo, H.C., Martinez, C.B.R., 2001. Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná. *Acta Sci.* 23, 507-514.
- Winston, G.W., Di Giulio, R.T., 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 19, 137-161.
- 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.
- Zhu, L., Huang, Y., Liu, G., 2005. Using DNA damage to monitor water environment. *Chinese J. Oceanol. Limnol.* 23, 340-348.
- Zorita, I., Ortiz-Zarragoitia, M., Apraiz, I., Cancio, I., Orbea, A., Soto, M., Marigómez, I., Cajaraville, M.P., 2008. Assessment of biological effects of environmental pollution along the NW Mediterranean Sea using red mullets as sentinel organisms. *Environ. Pollut.* 153, 157-168.