

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

Efeito dos herbicidas Roundup[®], Primoleo[®] e Facet[®] sobre o metabolismo intermediário, o estresse oxidativo e a sobrevivência de *Rhamdia quelen* em diferentes fases de desenvolvimento

Tanilene Sotero Pinto Persch

TESE DE DOUTORADO
PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
Av. Ipiranga 6681 - Caixa Postal 1429
Fone: (051) 3320-3500 - Fax: (051) 3339-1564
CEP 90619-900 Porto Alegre - RS
Brasil

2015

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

Efeito dos herbicidas Roundup[®], Primoleo[®] e Facet[®] sobre o metabolismo intermediário, o estresse oxidativo e a sobrevivência de *Rhamdia quelen* em diferentes fases de desenvolvimento

Tanilene Sotero Pinto Persch
Orientadora Prof. Dr.^a Guendalina Turcato Oliveira

TESE DE DOUTORADO
PORTO ALEGRE - RS - BRASIL

2015

Dedico este trabalho aos meus dois meninos, aos meus companheiros:

Entre cantorias e brincadeiras, mamás e colos, concluí, meu menino, meu **Heitor!**
*Meu menino canta, canta
Uma canção que é ele só que entende
E que o faz sorrir.*

*Meu menino tem nos olhos os mistérios
Dum mundo que ele vê e que eu não vejo
Mas de que tenho saudades infinitas.*

*As cinco pedrinhas são mundos na mão.
Formigas que passam,
Se brinca no chão,
São seres irreais...*

*Meu menino d'olhos verdes como as águas
Não sabe falar,
Mas sabe fazer arabescos de sons
Que têm poesia.*

*Meu menino ama os cães,
Os gatos, as aves e os galos,
(São Francisco de Assis
Em menino pequeno)
E fica horas sem fim,
Enlevado, a olhá-los.*

*E ao vê-lo brincar, no chão sentadinho,
Eu tenho saudades, saudades, saudades
Dum outro menino...*

Francisco Bugalho

Rafael, fostes mais que um esposo, mais que um amigo, mais que um companheiro. Graças a ti eu iniciei, contigo lutei. Foram quatro anos de muitas provas e, juntos, não desistimos de nada! Esta conquista devo ao teu esforço e dedicação para que eu pudesse ultrapassar todos os obstáculos e concluisse meu doutorado!

*O verdadeiro homem mede a sua força, quando se defronta com o obstáculo.
Antoine de Saint-Exupéry*

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, pelas palavras de conforto nos momentos de cansaço e desabafo, pela torcida e pela compreensão nos momentos de ausência, quando inúmeras vezes ouviram "não dá, tenho que cuidar dos peixes" ou "esse findi vou pra bancada!". Minha mãe **Carla**, pelas vezes que gritei "mãããe, fica com o Heitor" e meu pai **Braulio**, que muito teve que compreender minha ausência nos "eventos familiares".

Não posso deixar de valorizar o apoio de meus sogros e minha cunhada. Pelos debates empolgados sobre os peixes com meu sogro **Delmar**, e pelas vezes que fostes comigo à piscicultura. Minha sogra **Margarete**, que sempre se preocupou com os prazos e compreendeu nossa ausência. E à **Neca**, pelos livros emprestados, momentos de "filosofar" sobre os resultados... obrigada por todo carinho.

Obrigada pelo carinho e apoio que recebi também de meus irmãos **Diogo, Stella, Cláudio e Luísa** e minha madrastra **Tháís**, pelos questionamentos interessados e pelo apoio incansável. Obrigada **Elenice**, pelo carinho e pela correção do Abstract (mais uma vez!).

À minha orientadora, **professora Guendalina**, pela confiança e dedicação nestes quatro anos de trabalho. Como tu mesma intitula-se minha "mãe científica", obrigada por todos os ensinamentos que me ajudaste a construir!

Nesta jornada também fiz grandes amigas! Obrigada **Betânia**, por ter ido além de teu trabalho técnico e ter se tornado uma grande amiga também fora do laboratório. Foram muitas cuias de chimarrão, negrinhos, músicas, tudo em meio aos artigos, tabelas de Excel e muitas risadas. Tornastes estes quatro anos muito melhores.

Não posso deixar de valorizar e agradecer o empenho e a dedicação dos estudantes de IC que participaram de meu projeto. **Rodrigo**: aprendemos muitas padronizações juntos, "remamos" no início e estivestes sempre disposto e bem-humorado, mesmo quando não eras mais "oficial"! À **Patrícia**, agora mestranda, que sob muita organização de horários conseguimos concluir nossos trabalhos juntas! E a ajuda da **Sarah**, que não era "oficialmente minha", mas veio chegando de mansinho, se oferecendo e querendo aprender, no final estava contribuindo nas discussões para os congressos! Pude ajudá-los no aprendizado científico, mas saibam que também aprendi muito ao lado de vocês! Tenho muito orgulho da equipe que, juntos, formamos.

Ao responsáveis pela Piscicultura Dalferth, **Sra. Gladis e Sr. Guinter**, pela parceria, prontidão e dicas de cultivo dos animais. A postura ética e dedicação de vocês é, sem dúvida, essencial ao sucesso do meio científico!

Agradeço também aos **professores Nelson e Jarbas**, pelo acompanhamento de minha pesquisa e preocupação com meu aprendizado, especialmente no momento da qualificação.

À **professora Ana Lúcia Chittó**, pela acolhida e dedicação em me auxiliar e orientar no estágio docente.

Obrigada à secretária do PPG-Zoo, **Luana**, pela paciência com as inúmeras dúvidas que surgem durante este processo.

RESUMO

Os agroquímicos são contaminantes aquáticos decorrentes das atividades antropogênicas, tendo como principal objetivo a eliminação de alguma forma de vida, sendo, portanto, lesivos inclusive à espécies não-alvo. É de extrema importância a padronização e a utilização de espécies bioindicadoras, em especial de organismos autóctones, além do desenvolvimento de testes de toxicidade ou bioensaios para avaliação dos impactos decorrentes das atividades agroindustriais. Assim, buscou-se verificar possíveis alterações bioquímicas, avaliar o balanço oxidativo e a sobrevivência de indivíduos do jundiá *Rhamdia quelen*, em duas faixas etárias, frente a testes de toxicidade aguda com diferentes concentrações de Roundup® (glifosato: 18, 36, 72 e 144µg/L), Primoleo® (atrazina: 2,5, 5, 10 e 15µg/L) e Facet® (quinclorac: 1,75, 3,5, 7 e 14µg/L). Foram realizados os procedimentos com alevinos (indivíduos com comprimento total entre 6 e 8 cm) e indivíduos recém-maturados sexualmente, chamados alevinões (com comprimento total superior a 18 cm). Todos os animais foram comprados de uma piscicultura e permaneceram por 7 dias em um período denominado Aclimação. Após, os agroquímicos foram aplicados individualmente, em concentrações semelhantes às relatadas para o ambiente natural e permitido pela legislação vigente em nosso país. Após 7 dias de exposição ao agroquímico, os animais foram eutanasiados por secção de medula cervical, e foram separados os tecidos branquial, hepático, renal e muscular, sendo congelados a -20°C. Nos alevinos, foram realizados agrupamentos dos tecidos de três indivíduos, devido seu baixo peso; os tecidos dos alevinões foram analisados individualmente. Estimou-se o efeito destes agroquímicos sobre o metabolismo intermediário, através da determinação dos níveis de glicogênio, proteínas totais, lipídeos totais e triacilgliceróis, nas duas faixas de comprimento. Avaliou-se também o efeito destes agroquímicos sobre o status oxidativo determinando a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), além dos níveis de lipoperoxidação (TBARS) nos quatro tecidos dos animais, das duas faixas de comprimento. Os procedimentos experimentais e as leituras bioquímicas foram realizados em triplicata. Ainda observou-se o efeito destes sobre a sobrevivência dos indivíduos em condições de cultivo experimental, nas duas faixas etárias, buscando a confirmação da subletalidade das concentrações determinadas para os testes. Os resultados estão organizados em três artigos, sendo o primeiro intitulado *Parâmetros metabólicos e balanço oxidativo de Rhamdia quelen alterado frente à exposição a herbicidas de lavoura de arroz (Roundup®, Primoleo® e Facet®)*, para a submissão à Revista Archives of Environmental Contamination and Toxicology, onde são apresentados os resultados obtidos para o metabolismo e o balanço oxidativo dos alevinos, que parecem ter conseguido modular suas enzimas a ponto de não sofrerem dano oxidativo frente aos herbicidas Roundup® (pelo aumento da CAT) e Primoleo® (sem alterações nas enzimas SOD e CAT). O Facet® provocou o aumento da lipoperoxidação, principalmente nos tecidos branquial, renal e muscular, apesar da elevação da SOD, agredindo significativamente a espécie. A composição bioquímica tecidual dos juvenis de *R. quelen* sofreu alterações significativas, podendo acarretar a danos principalmente no tecido branquial, conduzindo à perda da homeostase e podendo acarretar na morte dos animais e/ou a diminuição do sucesso reprodutivo, quando expostos cronicamente a estas substâncias e nestas concentrações. O 2º artigo, intitulado *Alterações metabólicas em jundiás expostos aos herbicidas de lavoura de arroz Roundup®, Primoleo® e Facet®*, versa sobre o metabolismo de alevinões, para submissão à Revista Environmental Pollution. Houve alterações no perfil metabólico de todos os tecidos amostrados, evidenciando uma responsividade tecidual diferenciada, sendo as brânquias e os rins os órgãos mais afetados com a exposição aos agroquímicos. O herbicida Facet® alterou significativamente o tecido branquial, sendo sugerido que os órgãos brasileiros competentes regulamentem o seu uso em normas protetivas ao meio ambiente. Por fim, o manuscrito do artigo *Status oxidativo e lipoperoxidação determinados pela exposição aos agroquímicos Roundup®, Primoleo® e Facet® em Rhamdia quelen*, aborda o estresse oxidativo sofrido pelos alevinões, a ser submetido à Revista Ecotoxicology and Environmental Safety. Neste trabalho os tecidos hepático e renal foram os mais afetados, e podemos inferir que o Facet® (quinclorac) foi o agroquímico mais tóxico aos indivíduos recém-maturados sexualmente, seguido do Primoleo® (atrazina) e após o Roundup® (glifosato). Pode-se, a partir deste conjunto de resultados, sugerir uma revisão na legislação vigente em nosso país, a fim de incluir produtos com o princípio ativo quinclorac na lista de tóxicos a serem controlados no ambiente natural.

Palavras-chave: peixes, metabolismo, estresse oxidativo, glifosato, atrazina, quinclorac

ABSTRACT

The effect of herbicides Roundup[®], Primoleo[®] and Facet[®] on metabolism, the oxidative stress and the survival of silver catfish *Rhamdia quelen* at different stages of development

Agrochemicals are water contaminants, resulting from anthropogenic activities, having as main objective the elimination of some form of life and, therefore, being harmful even to non-target species. It is utmost importance the standardization and the use of bioindicators, especially of native organisms, besides the development of toxicity tests or bioassays to assess the impacts of the agro-industrial activities. Thus, it was sought to identify possible biochemical changes, to evaluate the oxidative balance and the survival of individuals of catfish *Rhamdia quelen*, in two aged groups, facing acute toxicity tests with different concentrations of Roundup[®] (glyphosate: 18, 36, 72 and 144µg/L), Primoleo[®] (atrazine: 2.5, 5, 10 and 15µg/L) and Facet[®] (quinclorac: 1.75, 3.5, 7 and 14µg/L). The procedures were performed with fingerlings (individuals with total length between 6 and 8 cm) and sexually newly matured individuals, called young-adult (with total length of more than 18 cm). All the animals were purchased from a farm and were kept for 7 days in a period called Acclimatization. After, agrochemicals were applied individually, at concentrations similar to those reported for the natural environment and allowed by law in our country. After 7 days of exposing to the agrochemical, the animals were euthanized by cervical spinal cord section and the gill, liver, kidney and muscle tissues were separated and frozen at -20°C. In fingerlings, pools were performed, grouping the tissue from three individuals, due to their low weight; the tissues from young-adult were analyzed individually. It was estimated the effect of this agrochemicals on intermediate metabolism, by determining the glycogen levels, total proteins, total lipids and triacylglycerols, on the two length ranges. It was also evaluated the effect of this agrochemicals on the oxidative status determining the activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), and levels of lipid peroxidation (TBARS) in all the tissues from the animals on the two length ranges. The experimental procedures and the biochemical readings were performed in triplicate. It was also observed the effect of this agrochemicals on the survival of the individuals in experimental culture conditions, in both aged groups, searching for confirmation of sublethality of determined concentrations for testing. The results are organized into three articles. The first is entitled *Metabolic parameters and oxidative balance Rhamdia quelen changed after exposure to herbicides of rice crops (Roundup[®], Primoleo[®] and Facet[®])*, for submission to the journal Archives of Environmental Contamination and Toxicology, which presents the results obtained for the metabolism and the oxidative balance of fingerlings, which seem to have been able to modulate their enzymes as not to suffer oxidative damage front to Roundup[®] herbicide (by increasing CAT) and Primoleo[®] (without changes in SOD and CAT). The Facet[®] led to the increase of lipid peroxidation, especially in the gill, kidney and muscle tissues, despite the higher SOD, prejudicing the species significantly. The biochemical composition tissue of juveniles of *R. quelen* changed significantly, which may cause damages, mainly in the gill tissue, leading to a loss of homeostasis and it may result the death of the animals and/or the decrease of the reproductive success, when chronically exposed to these substances and concentrations. The second article entitled *Metabolic changes in silver catfish exposed to herbicide of rice crop Roundup[®], Primoleo[®] and Facet[®]*, is concerned to the young-adult metabolism, for submission to the journal Environmental Pollution. There were changes in the metabolic profile of all sampled tissues, showing a differentiated tissue responsiveness, being the gills and the kidneys the most affected organs by the exposure to agrochemicals. The herbicide Facet[®] changed the gill tissue significantly, and it was suggested that the relevant Brazilian agencies regulate its use in protective standards for the environment. Finally, the third manuscript Article *Oxidative status and lipid peroxidation determined by the exposure to agrochemicals Roundup[®], Primoleo[®] and Facet[®] in Rhamdia quelen* approaches the oxidative stress suffered by young-adults to be submitted to the journal Ecotoxicology and Environmental Safety. In this work the liver and kidney tissues were the most affected, and it can be inferred that the Facet[®] (quinclorac) was the most toxic herbicide to the sexually newly matured individuals, followed by Primoleo[®] (atrazine) and after by Roundup[®] (glyphosate). One can suggest, from this set of results, a review of the current legislation in our country, to include products with the quinclorac active principle into the toxic list to be controlled in the natural environment.

Keywords: fish, metabolism, oxidative stress, glyphosate, atrazine, quinclorac

RELAÇÃO DE FIGURAS

Figura 1. Foto de Rhamdia quelen	12
Figura 2. Efeitos das EROs sobre lipídios, proteínas e DNA	14
Figura 3. Sistema antioxidante	15
Figura 4. Estrutura química do glifosato	17
Figura 5. Estrutura química da atrazina	19
Figura 6. Estrutura molecular do quinclorac	20
Figura 7. Herbicidas utilizados nos procedimentos e tecidos acondicionados para análise	22
Figura 8. Imagem dos sistema de cultivo dos alevinos e dos alevinões	23
Figura 9. Resultados do metabolismo das proteínas totais (PT) dos alevinos	42
Figura 10. Resultados do metabolismo do glicogênio (GG) dos alevinos	43
Figura 11. Resultados do metabolismo de lipídeos totais (LT) dos alevinos	44
Figura 12. Resultados do metabolismo de triacilgliceróis (TAG) dos alevinos	45
Figura 13. Resultados do metabolismo no tecido branquial dos alevinões	63
Figura 14. Resultados do metabolismo no tecido hepático dos alevinões	64
Figura 15. Resultados do metabolismo no tecido renal dos alevinões	65
Figura 16. Resultados do metabolismo no tecido muscular dos alevinões	66
Figura 17. Resultados da atividade das enzima Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e medida de lipoperoxidação (TBARS) dos alevinões	84
Figura 20. Gráfico do tempo de luminosidade durante o verão	88

RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 1. Organização do número de animais em aquários e tempo de experimento, por procedimento experimental _____ 23

Tabela 2. Organização dos grupos e agroquímicos aos quais os peixes foram expostos _____ 31

Tabela 3. Resultados do balanço oxidativo dos alevinos de *Rhamdia quelen* _____ 46

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	10
Estudo do metabolismo e balanço oxidativo _____	12
Determinações teciduais _____	15
Os agroquímicos: Roundup [®] , Primoleo [®] e Facet [®] _____	17
Desenho experimental _____	21
Organização dos artigos _____	24
CAPÍTULO 1	26
Parâmetros metabólicos e balanço oxidativo de <i>Rhamdia quelen</i> alterado frente à exposição a herbicidas de lavoura de arroz (Roundup [®] , Primoleo [®] e Facet [®]) _____	27
CAPÍTULO 2	47
Alterações metabólicas em jundiás expostos à herbicidas de lavouras de arroz (Roundup [®] , Primoleo [®] e Facet [®]) _____	48
CAPÍTULO 3	67
Status oxidativo e lipoperoxidação de <i>Rhamdia quelen</i> determinados pela exposição aos agroquímicos Roundup [®] , Primoleo [®] e Facet [®] _____	68
CONCLUSÕES	85
NORMAS DE PUBLICAÇÃO	89
Artigo 1: Archives of Environmental Contamination and Toxicology _____	90
Artigo 2: Environmental Pollution _____	92
Artigo 3: Ecotoxicology and Environmental Safety _____	95
REFERÊNCIAS	99

APRESENTAÇÃO

Os agrotóxicos são contaminantes aquáticos decorrentes das atividades antropogênicas, tendo como principal objetivo a eliminação de alguma forma de vida, sendo, portanto, letais inclusive à espécies não-alvo. Além da letalidade, alterações em diversos níveis de organização fisiológica e morfológica podem ser observadas como, por exemplo, nos músculos, fígado, glândulas endócrinas e outros tecidos ou órgãos de populações e comunidades diversas (Albinati et al., 2009). O uso de pesticidas tem resultado na poluição dos ambientes aquáticos por todo o planeta chegando a estes ecossistemas por diferentes rotas: aplicação direta, descargas industriais e urbanas, escoamento superficial a partir de fontes difusas, incluindo solos agrícolas, aerossóis, partículas de deposição e precipitação, entre outras (Ballesteros et al., 2009; Sharma, 1990).

Dentro deste contexto, torna-se de extrema importância a padronização e a utilização de espécies bioindicadoras, em especial de organismos autóctones, e do desenvolvimento de testes de toxicidade ou bioensaios para avaliação dos impactos decorrentes das atividades agroindustriais. Para selecionar quais as melhores espécies para estes procedimentos, a biologia e a distribuição da espécie no ambiente natural, assim como a sua localização dentro da estrutura trófica devem ser bem conhecidos, evitando gerar mais impactos no ambiente; além da manutenção e do cultivo adequado em laboratório para a realização dos bioensaios. Bianchini et al. (2006) ainda defendem que sejam utilizadas espécies que ocupem diferentes nichos ecológicos, pois as maneiras de acumulação e metabolização dos xenobióticos podem ser diferenciadas em decorrência das propriedades destes poluentes.

Os tecidos de peixes são ferramentas sensíveis à exposição de estressores ambientais, pois sofrem de forma nítida com estes compostos químicos (Albinati et al., 2009). Bianchini et al. (2006) explicitam que fluidos corpóreos, células e tecidos são bons indicadores da presença de contaminantes. Eles destacam a utilização destes pois, para que se possa detectar e avaliar o impacto dos agroquímicos no ambiente, é importante observar as diferenças nas formas dos organismos metabolizarem tais poluentes e não apenas avaliar a quantidade de poluentes no ambiente e nos animais. Isso porque alguns xenobióticos são pouco metabolizados

ou eliminados (como o DDT), sendo acumulados ao longo das cadeias tróficas, encontrando-se em altas concentrações apenas em tecidos de predadores de topo de cadeia (Bianchini et al., 2006; Livingstone, 1998).

Espécies autóctones brasileiras são pouco utilizadas ainda em investigações toxicológicas, apesar da riqueza de nossa biodiversidade (Albinati et al., 2009). Assim, foi escolhida a espécie nativa *Rhamdia quelen*, popularmente chamada no Brasil de jundiá, jandiá, mandi ou sapipoca; e no exterior de *silver catfish* (Reis et al., 2003). É amplamente distribuída na região Sul da América do Sul, e considerada rústica por se adaptar facilmente a diferentes faixas de pH, temperatura, dureza e amônia (Baldisserotto & Neto, 2004). Essas peculiaridades arroladas, aliadas a um número relativamente alto de indivíduos, justificam a utilização desta espécie em testes de bioindicação.

Rhamdia quelen um peixe de couro, classificado dentro da família Heptapteridae, na ordem Siluriformes da série Teleostei, classe Osteichthyes, tendo sido descrito em 1824 por Quoy & Gaimard (como *Pimelodus quelen*), e após reorganizado sistematicamente nesta família e gênero (Reis et al., 2003). Sua coloração diversifica-se de marrom-avermelhado claro a cinza, com o ventre corporal mais claro. Esta variação está relacionada com o ambiente, tendendo a clarear em ambientes mais claros e a escurecer em ambientes escuros. O jundiá apresenta três pares de barbilhões, localizados junto à boca (Figura 1). Estes apêndices provavelmente auxiliam na percepção da qualidade da água e na localização do alimento (Baldisserotto & Neto, 2004). Antes do primeiro ciclo reprodutivo, a sexagem pode ser feita apenas por visualização direta das gonadas, estando os machos maturados sexualmente com 16,5 cm e as fêmeas com 17,5 cm (Baldisserotto & Neto, 2004). Apenas após a primeira reprodução a sexagem pode ser feita a olho nú devido ao dimorfismo sexual existente, podendo ser diferenciados os gêneros pela observação do aparelho reprodutor, em seu ventre, anterior à abertura anal. Os mesmos autores ainda apontam que esta é considerada uma espécie de grande aceitação comercial, por sua carne possuir sabor agradável e excelentes características para o processamento industrial.



Figura 1. Foto de *Rhamdia quelen*, extraída de vivaterra.org.br.

Desta maneira, buscou-se verificar possíveis alterações bioquímicas, avaliar o balanço oxidativo e a sobrevivência de indivíduos de *Rhamdia quelen*, em duas fases do desenvolvimento (alevinos não maturados sexualmente e alevinões recém-maturados), frente a testes de toxicidade aguda com diferentes concentrações de Roundup® (formulação comercial do glifosato), Primoleo® (formulação comercial da atrazina) e Facet® (formulação comercial do quinclorac).

Estudo do metabolismo e balanço oxidativo

Fanta et al. (2003) destacam a importância de se estudar parâmetros morfológicos e fisiológicos em peixes expostos à concentrações subletais de agrotóxicos. Isto porque muitos poluentes existentes no ambiente aquático, seja por períodos curtos ou longos de exposição, não acarretam na mortalidade imediata dos organismos não-alvo, contudo causam doenças e reduzem a aptidão para a vida. Os autores afirmam que, o simples fato de uma concentração ser subletal não é garantia de que esta seja segura e que possa ser utilizada de maneira indiscriminada. Assim, as análises fisiológicas podem prover estratégias de resposta ao estresse causado pelo agrotóxico visando a manutenção da homeostase do organismo.

O glicogênio é um polímero de glicose utilizado como fonte energética, ocorrendo a degradação deste polissacarídeo como forma de suprir a demanda de energia, elevada dos peixes após situações de estresse (Sancho et al., 1997). O conteúdo de glicogênio pode ser alterado quando o animal sofre estresse ambiental, configurando uma alteração bioquímica (Bidinotto et al., 1997) em resposta à alta necessidade energética compensatória do tóxico agressor e conversão deste em glicose para manter a homeostase energética (síntese de ATP).

Os lipídeos do corpo encontram-se geralmente compartimentalizados, devido sua insolubilidade em soluções aquosas. São encontrados associados às membranas, nos adipócitos brancos associados às gotículas de triacilgliceróis, no plasma associados às proteínas, entre outras situações. Além de ser uma importante fonte de energia, podem atuar como coenzimas (algumas vitaminas lipossolúveis) e no controle da homeostasia do organismo (hormônios esteróides) (Harvey & Ferrier, 2012).

Os triacilgliceróis presentes nos quilomicra são hidrolisados em vários tecidos corpóreos, como rins, fígado e, principalmente, no músculo esquelético e tecido adiposo. Estes triacilgliceróis são degradados a ácidos graxos livres e glicerol pela lipase lipoprotéica, podendo entrar nas células musculares adjacentes, nos adipócitos e serem transportados pelo sangue com a albumina sérica (secretada pelo fígado). As células podem oxidar estes ácidos graxos para produzir energia, e também reesterificar os ácidos graxos livres em triacilgliceróis para armazenamento. Os triacilgliceróis também liberam glicerol, utilizado pelo fígado (na produção de glicerol-3-fosfato), podendo entrar na glicólise e na gliconeogênese. No fígado ainda ocorre a endocitose dos quilomicra remanescentes (ésteres de colesterol, fosfolipídeos, alguns triacilgliceróis, entre outros), sendo o colesterol e as bases nitrogenadas dos fosfolipídeos reciclados pelo corpo (Harvey & Ferrier, 2012).

As proteínas desempenham um papel vital na arquitetura e na fisiologia das células. O catabolismo de proteínas e aminoácidos desencadeia a produção de energia nos peixes (Samanta et al., 2014), podendo ser uma resposta ao estresse causado pela exposição aos xenobióticos, como os herbicidas.

Segundo Ahmad et al. (2000), os diversos poluentes ambientais, incluso os herbicidas, ocasionam uma situação de estresse oxidativo em diversos organismos aquáticos, como os peixes, devido a um aumento na produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), que são produzidas mesmo na ausência de xenobióticos, com suas respostas variando não apenas entre as espécies, mas também entre os diferentes tecidos de peixes, o que é atribuído às diferenças nos mecanismos antioxidantes. Sies (1993) explicita que o estresse oxidativo pode ser definido como um desbalanço entre os agentes pró-oxidantes e os antioxidantes, podendo ocorrer dano quando as quantidades de pró-oxidantes são maiores, sendo chamado de estresse oxidativo. Uma vez produzidas, as EROs podem modificar as

macromoléculas celulares em busca de estabilidade através de ligações químicas (Sies, 1993), muitas vezes levando a lesão cumulativa de tecidos e órgãos compostos especialmente por proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (Lushchak & Bagnyukova, 2006) (Fig. 2).

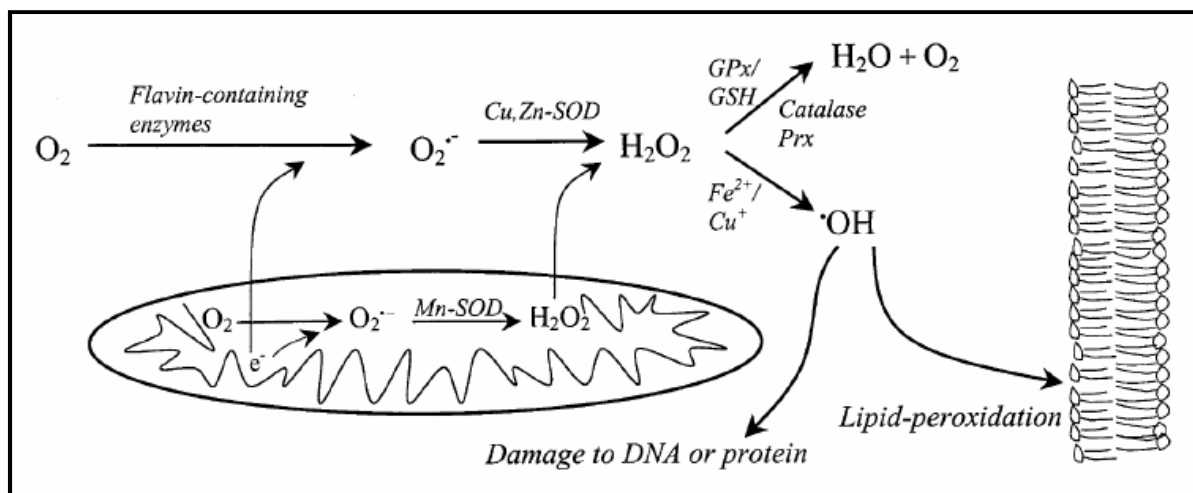


Figura 2. Efeitos das EROs sobre lipídios, proteínas e DNA (adaptado de Nordberg & Arnér, 2001, extraído de Moraes, 2008)

O estresse oxidativo é muito estudado nos peixes, já tendo sido evidenciado por diversos autores (Ballesteros et al. 2009; Ferreira et al., 2010; Jin et al., 2010; Menezes et al., 2012; Oruç & Usta, 2007; Pretto et al., 2011b; Sinhorin et al., 2014a; Toni et al., 2011, 2013) e alguns ainda sugerem a avaliação da peroxidação lipídica (Sayeed et al., 2003) podendo ser aliada a formação de proteína carbonil (Almroth et al., 2005), devido a importantes danos causados na fluidez da membrana e na integridade das biomoléculas associadas à esta, como proteínas integradas às membranas ou ao colesterol (Almroth et al., 2005). Os radicais livres atuam sobre as membranas biológicas, pois estas são ricas em lipídios (em especial os ácidos graxos poliinsaturados), causando assim uma reação em cadeia conhecida como lipoperoxidação (Lushchak & Bagnyukova, 2006; Oruç & Usta, 2007).

As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) indicam a intensidade da peroxidação lipídica, pois o malondialdeído (que participa da reação com o ácido tiobarbitúrico) é um dos produtos finais da peroxidação. Assim, avaliamos a quantidade deste produto final para determinar se há ou não intensa peroxidação lipídica (Lushchak & Bagnyukova, 2006), sendo uma ferramenta eficaz e muito utilizada para detecção de peroxidação lipídica em peixes (Almroth et al., 2005).

Há dois tipos de sistemas antioxidantes: o não-enzimático (composto de metabólitos como o ácido ascórbico, a glutathiona e o tocoferol) e o enzimático. Em organismos aquáticos, as enzimas antioxidantes mais estudadas são a catalase (CAT), a glutathiona peroxidase (GPx), a glutathiona S-transferase (GST) e a superóxido dismutase (SOD). As enzimas SOD e CAT representam a primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo (Atli & Canli, 2007), sendo o aumento na atividade destas comumente observado em casos de poluição ambiental (Zocche et al., 2014). A superóxido dismutase (SOD) atua prevenindo a formação da peroxidação lipídica pela catalisação do iniciador da peroxidação lipídica e da transformação dos radicais superóxido (O_2^-) em H_2O_2 e O_2 ; assim, ela desempenha um papel importante na proteção dos organismos contra o estresse oxidativo, sendo que a maioria dos estudos realizados sobre os antioxidantes como biomarcadores para o ambiente aquático foram em peixes (Tao et al., 2013). A catalase (CAT) é considerada uma das enzimas mais importantes do sistema antioxidante, estando localizada nos peroxissomos e, junto da enzima GPx, realiza a redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) produzido pela metabolização das longas cadeias de ácidos graxos (Zhang et al., 2004). Moraes (2008) afirma que uma elevação da atividade da CAT em nível tecidual, em peixes, pode significar uma possível resposta antioxidante do organismo. Na Figura 3 é esquematizado o sistema antioxidante enzimático.

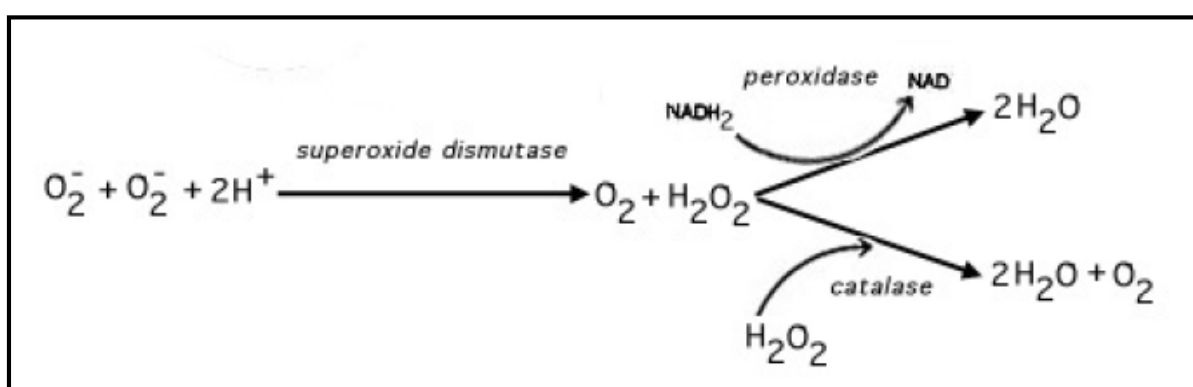


Figura 3. Sistema antioxidante (extraída de Moraes, 2008).

Determinações teciduais

Os tecidos foram escolhidos com base no seu papel funcional no indivíduo, e pela facilidade de separação, visando o menor tempo de manuseio e de degradação

tecidual. Por realizar trocas com o ambiente, as brânquias também são de extrema importância na regulação iônica, no equilíbrio ácido-base e na excreção de nitrogênio dos peixes de água doce, além de realizarem o balanço osmótico e a hematose (Paulino et al., 2012; Storer & Usinger, 2000). As brânquias são os primeiros órgãos a entrarem em contato com xenobióticos em água, assim as mudanças no tecido branquial podem reduzir as trocas gasosas (O_2 e CO_2) na lamela e causar desequilíbrio iônico e ácido-base (Paulino et al., 2012).

O fígado é o órgão mais importante na metabolização de substratos (Islam et al., 2002) e na detoxificação de substâncias tóxicas (Dong et al., 2009). Este é o principal órgão de metabolização dos nutrientes e ações enzimáticas do organismo, podendo ser considerado o órgão central do metabolismo. Suas ações envolvem o processamento, a distribuição e o fornecimento dos nutrientes a todos os órgãos e tecidos, através do sistema circulatório; contribuindo com a regulação dos níveis de glicose na corrente sanguínea de todos os organismos vertebrados. Também é considerado o órgão detoxificador, pois possui uma alta atividade metabólica, sendo o primeiro a reagir após uma situação de estresse (químico ou não), mesmo se ocorrida num curto espaço de tempo (Lehninger et al., 2002), estando envolvido nos processos metabólicos de glicólise, glicogênese, gliconeogênese e glicogenólise (Rahimi & Abdollahi, 2007), entre outros.

Nos peixes límnicos, os rins são duas estruturas delgadas e escuras, situadas dorsalmente. Produzem excretas fluidas e nitrogenadas, a partir da remoção destes do sangue. Este processo de remoção ocorre através de uma ultrafiltração glomerular, onde os metabólitos essenciais (glicose, aminoácidos, proteínas) são devolvidos à circulação sanguínea, junto da água, por mecanismos de reabsorção. Os resíduos eliminados visam o equilíbrio de água e íons, e a excreção de dejetos tóxicos ao organismo, normalmente por mecanismos de secreção de alta capacidade e baixa especificidade. As moléculas de amônia são excretadas neste processo, pois são tóxicas ao indivíduo, resultado estas do catabolismo protéico (Pough et al., 2008).

Finalmente, o tecido muscular é formado, principalmente, por proteínas e é o órgão responsável pelo fornecimento da força contrátil para o movimento (Moyes & Schulte, 2010). Hill et al. (2012) afirmam que, no músculo, o ATP é produzido por

três mecanismos principais: pela transferência do fosfato de alta energia da creatina para o ADP; pela glicólise e pela fosforilação oxidativa.

Os agroquímicos: Roundup[®], Primoleo[®] e Facet[®]

Os agroquímicos foram escolhidos pela sua ampla utilização nas lavouras do sul do país, em especial na orizicultura. Como o arroz passa grande parte do seu cultivo submerso (o arroz irrigado), muitas espécies de animais tem neste cultivo o seu habitat, sendo também encontrados muitos rios, lagos e açudes próximos aos locais de cultivo, que fornecem água em momentos de escassez de chuvas.

As propriedades herbicidas do glifosato foram descobertas em 1970, e a primeira formulação comercial foi elaborada em 1974 (Giesy et al., 2000; Glusczak, 2008). Sua formulação é bastante variável, conforme o fabricante, sendo basicamente sal de isopropilamina (IPA) do ácido N-fosfonometilglicina (Figura 4), um surfactante e a água. A empresa Monsanto do Brasil Ltda. fabrica o Roundup[®], de mesmo nome comercial na América do Norte, porém este princípio ativo também é comercializado como Sting, Alphee, Azural e Faena, e em sua maioria apresentam a mesma concentração de ácido equivalente, de 360 g/L (Glusczak, 2008).

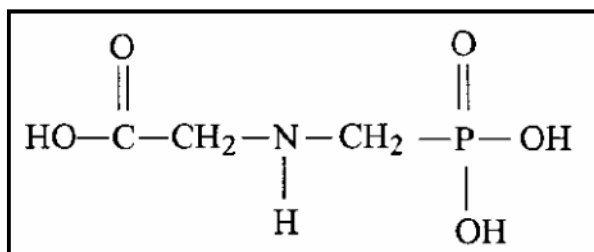


Figura 4. Estrutura química do glifosato (ácido N-fosfonometilglicina), adaptado de Rodrigues & Almeida (2005), extraído de Glusczak (2008).

Além do sal de glifosato, o produto apresenta ingredientes inertes, que deveriam ser apenas corantes ou outros ingredientes que não afetassem o organismo-alvo, nem modificasse a ação do pesticida (Brausch & Smith, 2007). Porém, sabe-se que os ingredientes inertes confidenciais atuam como solventes, surfactantes, conservantes e outros, sendo, em muitos casos, mais tóxico que o próprio princípio ativo (Glusczak, 2008). No Roundup[®] é utilizado o surfactante POEA (polioxietilenoamino), que facilita a penetração do produto na cutícula da

planta. Giesy et al. (2000) afirmam que o POEA chega a ser de duas a três vezes mais tóxico que o próprio glifosato.

Em água, o glifosato é altamente solúvel (15,700 mg/L a 25°C e pH 7) e estável em uma grande faixa de pH: de 3 a 9, em 35°C (Rodrigues & Almeida, 2005). Sua volatilidade e evaporação são consideradas insignificantes e a meia-vida torna-se reduzida na água pela redução na taxa de degradação, em razão da diferença na quantidade de microorganismos quando em comparação com a maioria dos solos. Assim, sua meia-vida no solo pode chegar a 197 dias, e na água a 42 dias quando a formulação comercial possuir como surfactante o POEA (polioxietilenoamino) (Giesy et al., 2000; Navarro & Martinez, 2014).

Estudos avaliam o metabolismo (Barcellos et al., 2003; Fanta et al., 2003; Gluszczak et al., 2006, 2007; Jasper et al., 2012; Moraes et al., 2007; Sinhorin et al., 2014b; Soso et al., 2007), o estresse oxidativo (Cericato et al., 2008; Ferreira et al., 2010; Jasper et al., 2012; Koakoski et al., 2014; Langiano & Martinez, 2008; Lushchak & Bagnyukova, 2006; Regina et al., 2008; Sinhorin et al., 2014a) e a histologia (Albinati et al., 2009; Langiano & Martinez, 2008) de animais expostos ao Roundup[®]. Os resultados são bem diversos, com alterações dependentes dos procedimentos experimentais, sendo que todos afirmam que o herbicida é um tóxico que induz a danos ambientais. Cabe salientar, conforme publicações dos autores já citados, que não existe enzima potencialmente afetada nos animais, posto que o glifosato é um inibidor do ácido chiquímico, exclusivo de vegetais, e sem equivalência em animais.

A Resolução do CONAMA nº 357/2005 dispõe sobre a classificação dos corpos de água, estabelecendo como valor máximo permitido para águas de classe II a concentração de glifosato de 65 µg/L. Já a Portaria Brasileira nº 518/2004 do Ministério da Saúde estabelece como padrão de potabilidade das águas para consumo humano a concentração máxima de 500 µg/L de glifosato. Ambas legislações estabelecem como valor máximo permitido para águas de classe II e água potável para consumo humano, respectivamente, a concentração de 2 µg/L de atrazina.

A atrazina, comercializada com o nome de Primoleo[®], é fabricada pela Syngenta Proteção de Cultivos Ltda. e tem como composição química 2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina (Figura 5). Sua solubilidade é baixa em água

(33mg/L, 20°C), ocorrendo o oposto quando diluído em solventes orgânicos (metanol, acetona, tolueno) (Tomlin, 1994).

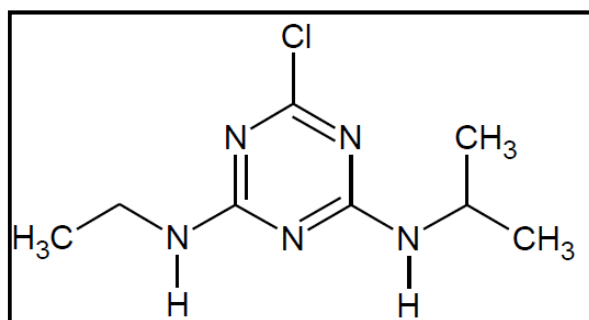


Figura 5. Estrutura química da atrazina, extraída de Carmo et al. (2013).

Carmo et al. (2013) afirmam que, se este herbicida contamina o solo, águas subterrâneas e/ou córregos, facilmente pode ser detectado no sistema de abastecimento público. Isto porque apresenta uma moderada adsorção à matéria orgânica e à argila quando no sistema água-solo, uma elevada persistência em solos, e a hidrólise é considerada lenta (105 a 200 dias), com alto potencial de escoamento superficial (Dores & De-Lamonica-Freire, 2001). A atrazina também é pouco afetada pelos processos de degradação natural, resultando na contaminação permanente de solo e água (Cericato et al., 2009).

O prejuízo causado pelo princípio ativo atrazina é relatado por diversos autores, e o grupo dos peixes é muito estudado, em especial a investigação de danos histopatológicos e estresse oxidativo nos tecidos branquial e hepático (Santos & Martinez, 2014; Jin et al., 2010; Mela et al., 2013; Moraes et al., 2007; Paulino et al., 2012; Pogrmic-Majkic et al., 2012; Salaberria et al., 2009; Xing et al., 2012). O efeito do Primoleo[®] é específico em plantas, também não possuindo equivalência em animais. Assim, pode-se presumir que, como enzimas potencialmente afetadas, a atrazina tende a ser um disruptor endócrino, com forte ligação pelos receptores de hormônios esteroidais, induzindo a feminilização, conforme literatura previamente citada.

O quinclorac é vendido pela a empresa Basf S/A com o nome comercial Facet[®], sob forma de pó. Segundo Grossmann & Kwiatkowski (2000), é um herbicida seletivo de baixa toxicidade ao homem e aos animais (Classe III). É amplamente utilizado nas lavouras de arroz por mimetizar auxinas, sendo de fácil aplicação e controle eficaz de ervas daninhas. A estrutura molecular do quinclorac é apresentada na imagem abaixo (Fig. 6):

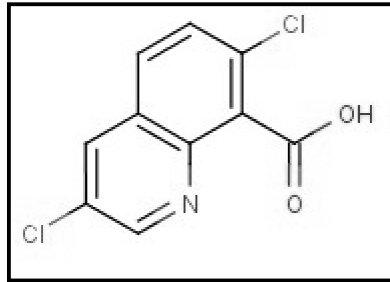


Figura 6. Estrutura molecular do quinclorac, conforme registro na CAS (Chemical Resumos Service).

O fabricante do Facet[®] afirma na bula do produto que este pode causar danos em ambientes aquáticos, em longo prazo, sendo altamente solúvel. Recomenda ainda que não deva ser aplicado em solos arenosos nem em condições extremas. No caso de culturas de arroz irrigado, mesmo em cuidado com áreas vizinhas, como recomenda o fabricante, por ser altamente solúvel e relativamente móvel, acredita-se que o quinclorac pode ser encontrado longe do local de aplicação, afetando não apenas as espécies da cultura selecionada. O fabricante do Drive[®] (produto extremamente similar ao Facet[®], de mesmo princípio ativo e também desenvolvido pela empresa Basf S/A) divulgou por nota técnica que o quinclorac é extremamente estável, possuindo meia-vida de até 365 dias em situações aquáticas anaeróbicas; e tempo superior a um ano em ambientes aquáticos e aeróbicos, em argila siltosa inundadas e solos argilosos siltosos. Não há legislação regulamentando o uso deste agroquímico no Brasil.

O efeito deste herbicida nos animais foi pouco estudado até o momento, sendo a maior parte das publicações com peixes. Miron et al. (2005) provaram que indivíduos de *Rhamdia quelen* sofreram com a interação com o herbicida em questão, apresentando CL₅₀ de 395 mg/L (394-395,9), e observaram também um aumento na hidrólise do neurotransmissor acetilcolina; Menezes et al. (2012) avaliaram o efeito da ingestão de difenil-diselenide como medida protetiva em carpas expostas a este agroquímico; Dornelles & Oliveira (2014) atestaram o efeito maléfico deste agroquímico em girinos de rã-touro. Não há ainda uma tendência de moléculas possivelmente afetadas pelo Facet[®] em animais, necessitando mais estudos com diferentes níveis taxonômicos.

Cabe salientar o grande potencial agroindustrial de nosso Estado, com cultivo de diversas frutas, extensas áreas de plantações de arroz e soja. Tais

peculiaridades nos incentivam a ampliar o número de espécies nativas, como também o número de marcadores bioquímicos e funcionais frente ao uso de tóxicos como o Roundup[®], o Primoleo[®] e o Facet[®]. Devemos destacar também que estes herbicidas foram escolhidos por serem amplamente utilizados em lavouras nas regiões de planície e planalto do Rio Grande do Sul, onde é encontrada a espécie supracitada, bem como, estão na lista de pesticidas que estão sendo reavaliados quanto a sua toxicidade pela ANVISA.

Desenho experimental

Todos os animais foram comprados de uma piscicultura, localizada na cidade de Teutônia/RS. Buscou-se comparar duas faixas etárias, a fim de avaliar possíveis diferenças de acordo com o desenvolvimento do animal. Para isto, foram realizados os procedimentos com alevinos (indivíduos com comprimento total entre 6 e 8 cm) e indivíduos recém-maturados sexualmente, chamados alevinões (com comprimento total superior a 18 cm). Os procedimentos de transporte (realizados em sacos plásticos) e soltura dos animais nos aquários seguiram as recomendações publicadas por Baldisserotto & Neto (2004).

Todos os animais permaneceram por 7 dias em um período denominado "Aclimação". No último dia deste período, 1/3 da água foi trocada visando a redução dos níveis de amônia, procedimento repetido no início do 8º dia, sendo o agroquímico introduzido na água somente 8 horas após este procedimento. Não foram realizadas trocas de água durante o período de exposição dos animais aos agroquímicos, sendo estes aplicados em concentrações semelhantes às relatadas para o ambiente natural e permitido pela legislação vigente em nosso país (Deschamps et al., 2013; Paulino et al., 2012; Queiroz et al., 2011), conforme descrito na Tabela 1. Como as concentrações utilizadas foram extremamente baixas, o que torna muito imprecisa a pipetagem direta do agroquímico para o aquário, foram preparadas soluções de diluição dos três produtos, a fim de aumentar o volume a ser pipetado e a precisão do procedimento (Fig. 7A).

Durante todo o período experimental, controlou-se os níveis de amônia, com kit para Amônia Tóxica em Água Doce, da LabconTest; bem como os níveis de pH com pHmetro portátil da marca Denver Instrument, permanecendo sempre entre 6,7 e 7,2. Utilizou-se ração similar à fornecida pela piscicultura aos animais, com 43% de

proteína bruta. Os alevinos foram mantidos em aquários com 2 litros de água por animal (em relação de 1,82 g/L) e os alevinões com 6 litros de água por indivíduo (em relação de 6,3 g/L).

Após 7 dias de exposição ao agroquímico, os animais foram eutanasiados por secção de medula cervical, e foram separados os tecidos branquial, hepático, renal e muscular, acondicionados em eppendorfs e congelados a -20°C para posterior pesagem e processamento, de acordo com o protocolo para cada análise. Nos alevinos, foram realizados agrupamentos dos tecidos de três indivíduos, devido seu baixo peso. Os tecidos dos alevinões foram analisados individualmente.

Estimou-se o efeito destes agroquímicos sobre o metabolismo intermediário, através da determinação dos níveis de glicogênio, proteínas totais, lipídeos totais, e triacilgliceróis, nas duas faixas de comprimento. Avaliou-se também o efeito dos herbicidas sobre o *status* oxidativo determinando a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) e os níveis de lipoperoxidação (TBARS) nos quatro tecidos do animal (Figura 7B), das duas faixas de comprimento. Todos os protocolos para as análises já haviam sido padronizados pelo Laboratório de Fisiologia da Conservação. Ainda observou-se o efeito destes sobre a sobrevivência dos indivíduos em condições de cultivo experimental, nas duas faixas etárias, buscando a confirmação da subletalidade das concentrações determinadas para os testes.



Figura 7. (A) Herbicidas utilizados nos procedimentos; (B) Tecidos acondicionados em *eppendorfs* para análise.

Em decorrência de uma reforma estrutural no edifício destinado ao cultivo dos animais, denominado *Vivário* (localizado no Prédio 12 da Universidade), não foi possível realizar procedimentos de cultivo idênticos com as duas faixas etárias. Desta forma, o cultivo dos alevinos foi realizado durante o verão, com os parâmetros de temperatura e luminosidade controlados, no prédio do *Vivário*; enquanto que o

cultivo dos aleviões foi na mesma estação do ano, porém à temperatura e luminosidade natural (Figura 8), em uma sala externa do Museu de Ciências e Tecnologia (MCT) (Prédio 41). Ambos os procedimentos experimentais foram bem sucedidos, porém esta diferença de tratamento impossibilitou a realização de comparações diretas entre os grupos etários. As análises bioquímicas seguiram os mesmos protocolos, apenas com alteração do número de indivíduos entre os grupos etários; isto devido ao tamanho inferior dos órgãos dos alevinos, para perfazer uma quantidade de homogeneizado que permitisse leituras em triplicata.



Figura 8. (A) Imagem do sistema de cultivo dos alevinos, com temperatura e luminosidade controladas, no edifício do *Vivário*; (B) sistema de cultivo dos aleviões, com temperatura e luminosidade naturais, na Sala Externa do MCT; (C) detalhe da estrutura da Sala Externa, parede em frente aos aquários. Fotos de autoria.

O protocolo experimental foi autorizado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da PUCRS, sob registro nº 11/00276. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, com número de indivíduos descrito na Tabela 1, e as leituras das análises bioquímicas e enzimáticas também foram realizadas em triplicata.

Tabela 1. Organização do número de animais em aquários e tempo de experimento, por procedimento experimental. (1) Os animais do grupo “Controle Exposição” permaneceram os sete dias de exposição sem contato com herbicida, pois este seguiu como controle da saúde dos animais até o final do experimento. (2) Foram utilizadas apenas duas concentrações de cada herbicida, na exposição dos aleviões, descritas no corpo dos artigos.

	Aquário	Nº indivíduos (em triplicata)		Tempo de aclimação	Tempo de exposição
		Alevinos	Aleviões		
Controle	7 dias (controle aclimação)	24	10	7 dias	-
	14 dias (controle exposição)	24	10	7 dias	7 dias ¹
Herbicidas	Concentração 1	24	10	7 dias	7 dias
	Concentração 2	24	10	7 dias	7 dias
	Concentração 3	24	- ²	7 dias	7 dias
	Concentração 4	24	-	7 dias	7 dias
Total de animais (por herbicida, em triplicata)		144	40		
Total de animais do projeto (considerando os 3 herbicidas)		432	120		
		552			

Organização dos artigos

Os resultados estão organizados em três artigos, tendo os manuscritos no corpo desta tese na forma de capítulos. No Capítulo 1 encontra-se o artigo *Metabolismo intermediário e balanço oxidativo de Rhamdia quelen alterado frente à exposição a herbicidas de lavoura de arroz (Roundup[®], Primoleo[®] e Facet[®])*, nas normas para a submissão à Revista *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. Neste são apresentados os resultados obtidos para o metabolismo e o balanço oxidativo dos alevinos, que parecem ter conseguido modular suas enzimas a ponto de não sofrerem dano oxidativo frente aos herbicidas Roundup[®] (pelo aumento da CAT) e Primoleo[®] (sem alterações em SOD nem em CAT). Contudo, o Facet[®] provocou o aumento da lipoperoxidação, principalmente nos tecidos branquial, renal e muscular, apesar da elevação da SOD, agredindo significativamente a espécie. A composição bioquímica tecidual dos juvenis de *R. quelen* sofreu alterações significativas, podendo acarretar a danos principalmente no tecido branquial, conduzindo à perda da homeostase e podendo acarretar na morte dos animais e/ou a diminuição do sucesso reprodutivo, quando expostos cronicamente a estas substâncias e nestas concentrações.

O artigo intitulado *Alterações metabólicas em jundiás expostos aos herbicidas de lavoura de arroz Roundup[®], Primoleo[®] e Facet[®]* versa sobre o metabolismo alevinões, formando no Capítulo 2, estando nas normas para submissão à Revista *Environmental Pollution*. Houveram alterações no perfil metabólico de todos os tecidos amostrados, evidenciando uma responsividade tecidual diferenciada, sendo as brânquias e os rins os órgãos mais afetados com a exposição aos agroquímicos. O herbicida Facet[®] alterou significativamente o tecido branquial, sendo sugerido que os órgãos brasileiros competentes regulamentem o seu uso em normas protetivas ao meio ambiente.

Por fim, no Capítulo 3 encontra-se o manuscrito do artigo *Status oxidativo e lipoperoxidação determinados pela exposição aos agroquímicos Roundup[®], Primoleo[®] e Facet[®] em Rhamdia quelen*, abordando sobre o estresse oxidativo sofrido pelos alevinões, a ser submetido à Revista *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Podemos verificar neste trabalho que os tecidos hepático e renal foram os mais afetados, e inferir que o Facet[®] (quinclorac) foi o herbicida mais tóxico aos indivíduos recém-maturados sexualmente, seguido do Primoleo[®] (atrazina) e após o

Roundup® (glifosato). Pode-se, a partir deste conjunto de resultados, sugerir uma revisão na legislação vigente em nosso país, a fim de incluir produtos com o princípio ativo quinclorac na lista de tóxicos a serem controlados no ambiente natural.

Uma conclusão geral foi elaborada (Capítulo 4, página 87), elucidando a cerca de todo o projeto realizado, com considerações envolvendo os resultados obtidos nos três artigos produzidos. Após, encontram-se as normas para submissão das revistas, descritas no Capítulo 5, página 91.

CAPÍTULO 1

Parâmetros metabólicos e balanço oxidativo de *Rhamdia quelen* alterado frente à exposição a herbicidas de lavoura de arroz (Roundup[®], Primoleo[®] e Facet[®])

Parâmetros metabólicos e balanço oxidativo de *Rhamdia quelen* alterado frente à exposição a herbicidas de lavoura de arroz (Roundup[®], Primoleo[®] e Facet[®])

Tanilene Sotero Pinto Persch^{1,2}, Rodrigo Nizolli Weimer¹, Betânia Souza de Freitas¹, Guendalina Turcato Oliveira^{1,2,3*}

Resumo

Foi avaliada a resposta de juvenis de *Rhamdia quelen* (6 a 8cm de Comprimento Total) frente a exposição às concentrações subletais de Roundup[®] (18; 36; 72 e 144µg/L), Primoleo[®] (2,5; 5; 10 e 15µg/L) e Facet[®] (1,75; 3,5 e 7 e 14µg/L), através da determinação de proteínas totais (PT), glicogênio (GG), lipídeos totais (LT), triacilgliceróis (TAG), lipoperoxidação (TBARS), e da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), nas brânquias, fígado, rins e músculo. O Roundup[®] (glifosato) provocou alterações no tecido branquial, onde observou-se redução nas PT, GG e LT; no tecido hepático e renal houve depleção dos LT; aumento de PT no fígado e de GG no músculo. Frente ao Primoleo[®] (atrazina), todos os tecidos estocaram TAG e consumiram LT (exceto as brânquias, que reduziram as PT); ainda houve incremento do GG nos tecidos renal e muscular. O Facet[®] (quinclorac) provocou alterações principalmente no fígado (com elevação de PT, LT e TAG) e no músculo (com elevação de GG, LT e consumo de TAG); as brânquias mostraram apenas depleção das PT, e o tecido renal não teve seu metabolismo alterado. Estes peixes parecem conseguiram modular suas enzimas a ponto de não sofrerem dano oxidativo frente aos herbicidas Roundup[®] (pelo aumento da CAT) e Primoleo[®] (sem alterações nas enzimas SOD e CAT); o Facet[®] (quinclorac) aumentou a lipoperoxidação, principalmente nos tecidos branquial, renal e muscular, apesar da elevação da SOD, prejudicando a espécie. Mesmo não sendo considerados espécies-alvo para estes agroquímicos, *Rhamdia quelen* é prejudicada com a interação com estes herbicidas.

Palavras-chave

Toxicologia; Parâmetros metabólicos; Estresse oxidativo; peixes; glifosato; atrazina; quinclorac

Introdução

Peixes são excelentes indicadores da degradação ambiental, pois são organismos sensíveis a uma ampla gama de estressores, refletindo os efeitos ambientais por serem dependentes da qualidade da água e de macroinvertebrados como fonte alimentar, para que possam obter sucesso na reprodução, no crescimento e na sobrevivência da população (Fausch et al. 1990). Por terem um longo período de vida, efeitos como insucesso reprodutivo e mortalidade em diversas classes etárias são consequências de estressores ambientais. Assim, a maior vantagem de utilizar peixes, para Fausch et al. (1990), é que estes organismos podem indicar a qualidade do ecossistema aquático e de bacias vizinhas, pois manifestam a importância ecológica da perturbação ocorrida, por efeitos diretos e indiretos ao ecossistema aquático. Menezes et al. (2014) defendem a utilização de peixes teleósteos como indicadores de contaminação por poluentes como pesticidas, porque as suas respostas bioquímicas são semelhantes às encontradas em mamíferos.

Rhamdia quelen (Quoy e Gaimard, 1824) é um peixe de couro, classificado dentro da família Heptapteridae, na ordem Siluriformes da série Teleostei, classe Osteichthyes. Está distribuído do México a Argentina (Reis et al. 2003), sendo considerada uma espécie rústica devido a capacidade de sobrevivência a alterações da água como pH, dureza, amônia e oxigênio (Gomes et al. 2000). Sua coloração varia de marrom-

¹ Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Laboratório de Fisiologia da Conservação

² Faculdade de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Zoologia

³ Bolsista de Produtividade do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq - 307303/2012-8)

*Autor Correspondente em: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Faculdade de Biociências, Laboratório de Fisiologia da Conservação; Av. Ipiranga, 6681 prédio 12-C; Porto Alegre/RS/Brazil; Tel. +55 51 3320.3545, fax: +55 51 3320.3568 .

Endereços de e-mail: T.S.P.Persch (tanilene@hotmail.com); R.N.Weimer (rodrigo_nizolli@yahoo.com.br); B.S.Freitas (betania.freitas@puccrs.br); G.T.Oliveira (guendato@puccrs.br).

avermelhado claro a cinza, com o ventre corporal mais claro. Esta coloração varia de acordo com o ambiente, tendendo a clarear em ambientes mais claros e a escurecer em ambientes escuros. O jundiá apresenta três pares de barbilhões, localizados junto à boca. Estes apêndices provavelmente auxiliam na percepção da qualidade da água e na localização do alimento (Baldisserotto & Neto 2004). O hábito alimentar desta espécie é considerado onívoro generalista, no ambiente natural, tendo preferência por peixes, crustáceos, insetos, restos vegetais e detritos orgânicos, refletindo que não apenas se alimentam no habitat bentônico (Gomes et al. 2000). No Brasil, esta espécie está perfeitamente adaptada às diferentes estações climáticas e às variações extremas de temperatura, sobrevivendo às baixas temperaturas no inverno e obtendo sucesso de crescimento, bem como reprodutivo, no verão. Também é conhecido como jandiá, mandi e sapipoca. Possui boa aceitação comercial, sendo espécie potencial para cultivo tanto pela pesca, quanto para a alimentação, possuindo carne de sabor agradável e excelentes características para o processamento industrial (Barcellos et al. 2003).

O uso de agroquímicos tem resultado na poluição dos ambientes aquáticos, atingindo estes ecossistemas por diferentes rotas: aplicação direta, descargas industriais e urbanas, escoamento superficial a partir de fontes difusas, incluindo solos agrícolas, aerossóis, partículas de deposição e precipitação entre outras (Ballesteros et al. 2009; Sharma 1990). Tendo em vista a crescente preocupação com as alterações provocadas no ambiente aquático, resultante das diversas atividades humanas, cresce também a necessidade de padronização e de utilização de espécies bioindicadoras, bem como o desenvolvimento de testes de toxicidade ou bioensaios para avaliação destes impactos. Para o monitoramento do grau de degradação do ambiente e da saúde dos ecossistemas de lagos e rios torna-se necessário a utilização de peixes (Hued & Bistoni 2005). O método de detecção da ocorrência de espécies tolerantes e do desaparecimento de espécies intolerantes tem sido amplamente utilizado para indicar e mensurar a degradação ambiental (Fausch et al. 1990).

A importância das avaliações fisiológicas em organismos expostos à concentrações subletais é destacada por Fanta et al. (2003), pois possibilitam a compreensão da capacidade de manutenção das populações em ambientes contaminados. As mesmas autoras ainda afirmam que muitos pesticidas não são efetivos, pois possuem baixa toxicidade, porém são metabolicamente transformados em substâncias tóxicas ativas. Marcadores bioquímicos podem fornecer informações sobre o processo de metabolização de pesticidas, segundo Santos & Martínez (2012), pois o agente tóxico pode ser biotransformado por enzimas que tornam-o um composto menos tóxico e assim facilitam a sua excreção. Estudos mostram que em algumas espécies de peixes os herbicidas também podem causar distúrbios no metabolismo de carboidratos, proteínas e em parâmetros sanguíneos dos peixes (Menezes et al. 2014).

Para Shiogiri et al. (2012) as brânquias e o fígado dos peixes são os principais órgãos-alvo de moléculas xenobióticas, sendo que este último pode sofrer alterações no metabolismo de lipídios e de carboidratos, afetando indiretamente a função de outros órgãos. Paulino et al. (2012) destacam que as brânquias, os rins e o intestino desempenham um papel importante na biotransformação e excreção destes agroquímicos, embora o fígado seja conhecido por ser o principal órgão em que estes processos aconteçam. Estes autores concluíram em seu trabalho que as respostas metabólicas e enzimáticas são mecanismos de proteção contra a absorção dos tóxicos, e que se tais condições ambientais forem mantidas por muito tempo, os danos teciduais (principalmente nas brânquias) podem comprometer o metabolismo global do peixe, incluindo as vias envolvidas na reparação de tecidos, crescimento e reprodução.

O estresse oxidativo é caracterizado pelo excesso de Espécies Reativas de Oxigênio (EROS), como o radical ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\cdot OH$). A enzima superóxido dismutase (SOD) catalisa a conversão de O_2^- em H_2O_2 , enquanto a enzima catalase (CAT) decompõe o H_2O_2 até O_2 e H_2O (Thomaz et al. 2009). Estas EROS podem reagir com macromoléculas biológicas e produzir peroxidação lipídica (LPO), danos ao DNA e oxidação de proteínas, resultando em estresse oxidativo. Thomaz et al. (2009) afirmam que diferentes processos patológicos envolvidos na etiologia de diversas doenças de peixes estão associados aos contaminantes, a partir do estímulo excessivo à produção de EROS. Para os autores, estes danos e patologias podem ser percebidos em diversos grupos taxonômicos presentes nos ecossistemas aquáticos, visto que todos ecossistemas tropicais estão, atualmente, ameaçados pela degradação ambiental e pelas atividades antrópicas, entre as quais está o uso indiscriminado dos agrotóxicos como fungicidas, inseticidas, pesticidas e herbicidas.

A formulação dos herbicidas baseados em glifosato é bastante variável, conforme o fabricante, sendo o agroquímico mais popular a base de sal de isopropilamina (IPA) do ácido N-fosfometilglicina, surfactante e água, com meia-vida no solo de até 197 dias, e na água de até 42 dias, quando a formulação comercial possuir como surfactante o POEA (polioxietilenoamino) (Giesy et al. 2000). A empresa Monsanto do Brasil Ltda. fabrica o Roundup[®], de mesmo nome comercial na América do Norte, porém em outros países existem vários nomes como: Sting, Alphee, Azural e Faena. O glifosato é um inibidor do ácido chiquímico, exclusivo de vegetais e sem equivalência em animais, por isto não há enzima potencialmente afetada, causando distúrbios em diversos órgãos dos indivíduos aquáticos que venham a ingeri-lo (Aminov et al. 2014). Os mesmos autores afirmam que os animais aquáticos, em especial os peixes, são mais sensíveis ao Roundup[®] do que os mamíferos. Diversos estudos avaliam o efeito deste agroquímico em espécies de peixes expostos ao Roundup[®]: *Corydoras paleatus* por Fanta et al. (2003), *Rhamdia quelen* por Ferreira et al. (2010), Menezes et al. (2011) e Soso et al. (2007), *Leporinus macrocephalus* por Albinati et al. (2009), *Oreochromis niloticus*, *Cyprinus carpio* e *Colossoma macropomum* por Moura (2009). Mesmo com resultados diversos e alterações dependentes dos procedimentos experimentais, todos afirmam que o herbicida é um tóxico que induz danos ambientais. Atualmente, a USEPA classifica o princípio ativo glifosato como de baixa toxicidade ou não-tóxico às aves e aos mamíferos, não-tóxico a moderadamente tóxico aos invertebrados aquáticos, e de toxicidade baixa a moderada a peixes e anfíbios (Annett et al. 2014). A legislação brasileira permite, em ambiente natural limnítico, a presença de 65µg/L de glifosato (Resol. CONAMA nº357/2005).

O herbicida Primoleo[®] tem como princípio ativo a atrazina, e é fabricado no Brasil pela Syngenta Proteção de Cultivos Ltda. É um herbicida sistêmico seletivo, e age inibindo a fotossíntese e outros processos enzimáticos nas raízes e folhas das ervas daninhas (Tomlin 1994). Cericato et al. (2008) afirmam que este herbicida também é comumente utilizado combinado com outros, em especial com a simazina, recebendo o nome comercial de Herbimix[®], nas lavouras de soja e milho. Os mesmos autores ainda afirmam que este herbicida é pouco afetado pelos processos naturais de degradação, contaminando quase permanentemente a água e a superfície do solo devido sua elevada meia-vida. Conforme publicado pelo *Canadian Council of Ministers of the Environment* (1999), a meia-vida da atrazina é variável conforme o pH do substrato, podendo ser encontrada por 95 a 165 dias em solos de pH 4, de 145 a 350 dias em substratos de pH 7, e de 3 a 5 anos em locais com pH 8. Segundo a *International Agency for Research on Cancer*, a atrazina é classificada como “possivelmente carcinogênica aos humanos” (Roustan et al. 2014). Também é considerada tóxica aos peixes e anfíbios, mesmo

tendo sido desenvolvida como um fitotóxico, com concentrações letais dependentes das condições de exposição e da sensibilidade da espécie (Azevedo 2013; Paulino et al. 2012).

No Brasil, o herbicida Facet[®] também é muito utilizado, aplicado comumente nas culturas de arroz (*Oryza sativa*) na forma de spray (pulverização), em concentrações próximas a 0,75 mg/L (Rodrigues & Almeida 2005). O fabricante (a empresa Basf S/A) afirma, na bula do produto, que o químico pode causar danos em ambientes aquáticos, em longo prazo. A meia-vida encontrada por Pretto et al. (2011) para o quinclorac na água foi de apenas 5,85 dias, porém os autores afirmam que este valor pode se elevar quando a aplicação ocorrer em solo. Recomenda ainda que não deva ser aplicado em solos arenosos, nem em condições extremas. No caso de culturas de arroz irrigado, mesmo em cuidado com áreas vizinhas, como recomenda o fabricante, por ser altamente solúvel e relativamente móvel, acredita-se que o quinclorac (princípio ativo do Facet[®]) pode ser encontrado longe do local de aplicação, afetando não apenas as espécies da cultura selecionada. O fabricante do Drive[®], produto extremamente similar ao Facet[®] e também desenvolvido pela empresa Basf S/A, divulgou por nota técnica que o quinclorac é extremamente estável, possuindo meia-vida de até 365 dias em situações aquáticas anaeróbicas; e tempo superior a um ano em ambientes aquáticos e aeróbicos, em argila siltosa inundadas e solos argilosos siltosos. Não há legislação regulamentando o uso deste agroquímico no Brasil.

Com este trabalho buscou-se verificar possíveis alterações nos parâmetros metabólicos e no balanço oxidativo de indivíduos juvenis de *Rhamdia quelen*, frente a testes de toxicidade aguda com quatro concentrações dos herbicidas Roundup[®], Primoleo[®] e Facet[®].

Materiais e Métodos

Peixes

Os exemplares de *Rhamdia quelen* foram adquiridos de uma piscicultura, e passaram por sete dias de aclimação, em fotoperíodo claro-escuro de 12:12 horas, salinidade de 0psu, aeração constante, pH entre 6,7 e 7,2, temperatura controlada de 23±1°C e sendo alimentados uma vez ao dia, *ad libitum* com a mesma ração comercial que era ministrada na piscicultura. Todos os indivíduos possuíam comprimento total entre 6 e 8 cm.

Desenho experimental

Fim do período de aclimação, parte dos animais foram expostos aos agroquímicos e o restante foi mantido nas mesmas condições de aclimação e sem contato com os agroquímicos, constituindo o grupo controle. O período de exposição também perdurou por sete dias, mantendo-se os mesmos parâmetros de cuidado da etapa anterior. Os grupos e as concentrações dos agroquímicos utilizados estão descritos na Tabela 2. O experimento foi realizado com grupos de 24 animais por concentração, e o mesmo número de indivíduos foi utilizado no grupo-controle, totalizando 120 animais por herbicida e perfazendo uma triplicata.

As concentrações foram escolhidas com base tanto no publicado como no encontrado em corpos de água próximos de lavouras do sul do Brasil, considerando ainda os valores estipulados na legislação brasileira. Assim, os valores utilizados para o herbicida Roundup[®] (formulação original com 360g/L de glifosato, em concentrações entre 18 e 144µg/L) estão dentro da faixa permitida pela Portaria Brasileira nº 518/2004 do Ministério da Saúde para água potável para o consumo humano (concentração máxima de glifosato de 0,5mg/L, segundo a Portaria referida), tendo sido encontrado valores entre 0,1 e 0,7mg/L de glifosato em águas superficiais de áreas de cultivo de soja (Queiroz et al. 2011). Ainda para este agroquímico, o limite norte

americano deste herbicida em água potável, publicado pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) é de 700µg/L.

Tabela 2. Organização dos grupos e agroquímicos aos quais os peixes foram expostos.

Grupo	Princípio ativo	Concentrações (µg/L)
Controle	Sem interação com nenhum agroquímico	18
Roundup®	Glifosato	36
		72
		144
		2,5
Primoleo®	Atrazina	5
		10
		15
		1,75
Facet®	Quinclorac	3,5
		7
		14

Para o herbicida Primoleo® (formulação com 50% de atrazina), a legislação brasileira (Portaria nº 518/2004 do Ministério da Saúde) permite a presença de 2µg/L na água considerada potável ao consumo humano. Nos Estado Unidos, para a USEPA o valor máximo permitido deste herbicida em corpos d'água é de 3µg/L. Os valores escolhidos para este trabalho (de 2,5 a 15µg/L) baseiam-se no encontrado nas águas adjacentes a campos tratados, com concentrações variando entre 0,2µg/L e 1.000µg/L (Paulino et al. 2012). O mesmo autor citado anteriormente realizou sua análise com concentrações subletais de atrazina (2; 10 e 25µg/L) em brânquias de *Prochilodus lineatus*.

Não há legislação regulamentando o uso do princípio ativo do Facet® (produto em pó, com 75% de quinclorac) no Brasil, mesmo sendo um agroquímico amplamente utilizado. Como critério de escolha para determinar as concentrações que utilizamos, tomou-se como referência os trabalhos publicados com valores deste químico nas lavouras do sul do Brasil. Em águas límnicas de cultivo de arroz no sul do Estado de Santa Catarina foram encontradas concentrações do herbicida quinclorac entre 2,11 e 20,2µg/L (Deschamps et al. 2013). Desta forma, optamos pela utilização de quatro concentrações, entre 1,75 e 14µg/L de Facet®.

Fimdo os sete dias de exposição, foi realizada transecção de medula espinhal nos animais, sendo estes pesados em balança semi-analítica (precisão de 0,001g) e medidos com paquímetro digital (precisão 0,01cm). Reservaram-se para as análises bioquímicas as brânquias, o fígado, os rins e parte do músculo caudal (cerca de 1cm²). Como o comprimento de maturação sexual desta espécie é de 16,5cm e 17,5cm para machos e fêmeas, respectivamente (Baldisserotto & Neto 2004), não foi feita distinção entre os gêneros, pois todos os indivíduos encontravam-se entre 6 e 8cm de comprimento total, incapacitando a sexagem dos animais.

O protocolo experimental foi autorizado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da PUCRS, sob registro nº 11/00276, com *n* total igual a 486 animais (perfazendo triplicata, para os três herbicidas).

Preparação dos tecidos

Os tecidos foram congelados a -20°C para preservar a integridade destes, e após o congelamento, foram pesados individualmente. Estes foram agrupados, formando *pools* compostos pelos tecidos de três indivíduos para cada análise. Os *pools* foram processados conforme a necessidade de cada protocolo para as análises bioquímicas e enzimáticas, para os quatro órgãos analisados (brânquias, fígado, rins e músculo).

Determinações metabólicas

A homogeneização dos *pools* para as medidas de proteínas totais (PT) e glicogênio (GG) seguiram o protocolo de extração de Van Handel (1965), com variação na quantidade de reagente básico para a digestão dos tecidos (em brânquias e músculos, utilizou-se 0,8 mL de KOH 30%, já nos tecidos hepático e renal foram utilizados 0,4 mL da base), a 100°C por aproximadamente 6 horas. Concluída esta etapa, as amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm por 3 minutos para a realização das medidas de proteínas totais (PT), com o uso de kit comercial para proteínas (Labtest®) através da reação de biureto, por ser extremamente sensível e estável. As determinações foram feitas por espectrofotometria, a 545 nm, em triplicata sendo os valores expressos em mg de proteínas/g de tecido.

No restante do homogeneizado, acrescentou-se 2 gotas de Na₂SO₄ e 0,9 mL de álcool etílico absoluto, agitando-se e centrifugando-se a 10.000 rpm por 10 minutos; após, mais dois processos de lavagens foram realizadas com álcool etílico absoluto (0,9 mL) e 0,4 mL de água destilada, com centrifugação por mesmo tempo e rotação da etapa anterior, sempre descartando-se o sobrenadante. Foi realizada a ressuspensão do precipitado em 0,3 mL de água destilada, seguida de hidrólise ácida (com 0,1 mL HCl 4N em 0,1 mL da suspensão amostral, aquecidos a 100°C por uma hora) e neutralização (com 0,1 mL de Na₂CO₃ 2M). Para a quantificação da glicose liberada pela hidrólise do glicogênio utilizou-se o kit da Labtest® (Glicose PAP), que baseia-se no método da glicose oxidada, com medições espectrofotométricas em triplicata, a 505 nm, sendo os resultados finais expressos em mg de glicogênio/g de tecido.

Para as análises das reservas de gorduras foi realizada extração com clorofórmio:metanol (2:1), uma relação de 40 vezes o peso do *pool* em gramas (Folch et al. 1957), para realizar a homogeneização com equipamento tipo Turrax®, seguida da filtração da suspensão amostral. A esta foi acrescentado NaCl 0,9% (resfriado), na proporção de 2 mL de NaCl para cada 10 mL de homogeneizado. A suspensão foi centrifugada a 2.000 rpm por 10 minutos e descartada a fase superior. Este processo de lavagem e centrifugação foi realizado mais duas vezes, a fim de remover toda a mistura de clorofórmio:metanol.

Deste, uma alíquota foi destinada a determinação de lipídeos totais (LT), com uso do método da sulfosfovanilina (Frings & Dunn 1970). Adicionou-se 1 mL de ácido sulfúrico em 20 µL da suspensão amostral, permanecendo em tubos de vidro com tampa, aquecidos a 100°C por 10 minutos. Após esta reação, resfriam-se as amostras em banho de gelo para a adição de 2,5 mL de Vanilina, para coloração do produto apolar, seguindo-se a quantificação espectrofotométrica pela leitura da absorbância das amostras (em triplicata) a 530 nm. Os resultados são expressos em mg de lipídeos/g de tecido.

Outra alíquota destinou-se a dosagem de triacilgliceróis, utilizando-se o kit comercial para triglicerídeos da Labtest®, que segue a metodologia colorimétrica enzimática, com leituras em triplicata, 505 nm. Os valores estão expressos em mg de triacilgliceróis/g de tecido.

Ensaio enzimáticos

Para medir o balanço oxidativo, os tecidos foram homogeneizados em solução de Buffer Fosfato (20 mM, pH 7,4, acrescida de PSMF 1 mM), em volume de nove vezes o peso total do *pool*, com o auxílio de aparelho microtritador (Turrax®). Antes de cada análise, centrifugou-se o homogeneizado a 3.000 rpm por 3 minutos, utilizando-se sempre a interface.

A medida da atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD) foi realizada por cinética espectrofotométrica, a 480 nm, com uma leitura a cada 60 segundos, para a observação de uma curva com 5 pontos em 300 segundos. Foi utilizado tampão glicina (50 mM, pH 11, a 25°C), o homogeneizado preparado com Buffer Fosfato e epinefrina como catalisadora da reação enzimática. Esta foi preparada com 0,04 g de epinefrina (PM 333,33), 14 µL de HCl e 2 mL de água destilada, sendo mantida sempre em gelo e abrigada da luz. Foram realizadas 3 curvas com 5 leituras, sendo a primeira com 950 µL de tampão e 50 µL de homogeneizado, a segunda com 975 µL de tampão e 25 µL de homogeneizado e a terceira com 990 µL de tampão e 10 µL de homogeneizado, sempre totalizando 1.000 µL em cubeta de quartzo, mais 17 µL do preparado de epinefrina. Estes procedimentos foram realizados em temperatura ambiente, em triplicata, totalizando 3 curvas de cada concentração de homogeneizado, portanto 9 curvas por amostra, conforme determinado por Misra & Fridovich (1972).

A atividade da enzima Catalase (CAT, conforme Boveris & Chance 1973) também foi mensurada por cinética espectrofotométrica em temperatura ambiente, em triplicata, com curvas baseadas em 8 pontos distantes por 7 segundos cada (curva total analisada com 56 segundos, a 240 nm, em cubeta de quartzo). Para este procedimento, utilizou-se 955 µL de tampão fosfato (50 mM, pH 7,0, a 25°C), 10 µL de homogeneizado amostral e 35 µL de peróxido de hidrogênio (0,3M, preparado com 170 µL de H₂O₂ em 5 mL de água destilada), mantido sempre em gelo e abrigado da luz.

A medida de lipoperoxidação (LPO) foi realizada pela quantificação das Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), seguindo-se a reação com 100 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA 0,67%), 150 µL de ácido tricloroacético (TCA 10%), 50 µL de água destilada e 50 µL de amostra homogeneizada, conforme Buege & Aust (1978). Esta mistura foi aquecida a 100°C por 15 minutos. Acrescentou-se 300 µL de álcool n-butílico para extrair o produto apolar da solução aquosa, com centrifugação a 3.000 rpm por 10 minutos. As leituras espectrofotométricas foram realizadas no sobrenadante, em triplicata, a 535 nm, em cubeta de quartzo preta.

No mesmo homogeneizado com Buffer Fosfato, foi realizada medida das proteínas com kit comercial da Labtest[®], por espectrofotometria a 545 nm, em triplicata, para podermos assim mensurar a atividade da SOD (expressa em unidades de SOD/mg de PT.min, sendo uma unidade de SOD correspondente a quantidade de enzima que inibe em 50% a velocidade de oxidação do detector utilizado, neste caso a epinefrina), a CAT (em pmoles de decomposição do H₂O₂/mg de PT.min) e a lipoperoxidação (com os resultados expressos em nm de TBARS/mg de PT).

Todos os reagentes e demais produtos químicos utilizados possuíam alto grau de pureza e procedência garantida pelas empresas Merck[®] e Sigma-Aldrich[®].

Análises estatísticas

Utilizando os programas IBM SPSS Statistics 20.0 e BioEstat 5.0, os resultados foram analisados estatisticamente, com o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificação da normalidade; seguido de ANOVA de uma via para os resultados que obedeceram a hipótese nula, e do teste de Levene para verificar a normalidade e definir o teste complementar, sendo o teste da Diferença Mínima Significativa (quando assume-se que as variâncias são iguais) ou pelo teste de Games-Howell (para variâncias iguais não-presumidas). Para os resultados que seguem a hipótese alternativa (sendo assim considerados não-paramétricos), fez-se uso do teste de Kruskal-Wallis, complementado pelo teste Student-Newman-Keuls. O valor de significância de *p* igual ou menor que 5%

indica que existe relação entre as variáveis testadas (Zar 2010), estando os resultados expressos como média \pm erro padrão da média.

Resultados

O herbicida Roundup[®] provocou alterações metabólicas principalmente no tecido branquial, onde se observou depleção de proteínas totais nas três primeiras concentrações (Fig. 9-A), redução nos níveis de glicogênio na terceira concentração (Fig. 10-A) e consumo das reservas lipídicas nas concentrações de 18 $\mu\text{g/L}$ e 72 $\mu\text{g/L}$ (Fig. 11-A). Este herbicida também induziu ao consumo das reservas energéticas nas concentrações com 18 $\mu\text{g/L}$ e 144 $\mu\text{g/L}$ de Roundup[®], nos rins (Fig. 11-C); e com 18 $\mu\text{g/L}$ e 36 $\mu\text{g/L}$ de Roundup[®] no fígado (Fig. 11-B). Este último órgão ainda teve a síntese de proteínas estimulada nas concentrações extremas (18 e 144 $\mu\text{g/L}$, Fig. 9-B). O tecido muscular alterou apenas seus níveis de glicogênio, que apresentaram-se elevados com 36 $\mu\text{g/L}$ de Roundup[®]. Frente a este agroquímico, os indivíduos não alteraram os níveis de triacilgliceróis em nenhuma das concentrações utilizadas (Fig. 12). Mesmo com uma aparente elevação concentração-dependente no tecido renal (Tabela 3), os níveis da enzima superóxido dismutase não se alteraram significativamente em nenhuma situação experimental, com este agroquímico. Já a enzima catalase mostrou-se aumentada nos tecidos branquial (com uma elevação concentração-dependente, sem significância apenas na primeira concentração, Tabela 3) e muscular (apenas com 36 $\mu\text{g/L}$ de Roundup[®], Tabela 3). A elevação das atividades enzimáticas mostram-se eficazes no combate às Espécies Reativas de Oxigênio, posto que os níveis de lipoperoxidação não sofreram alterações significativas em nenhuma situação experimental (Tabela 3).

Frente ao Primoleo[®], nenhuma enzima antioxidante apresentou aumento em sua atividade quando os indivíduos foram expostos à este herbicida (Tabela 3) e uma redução nos níveis de TBARS renal (Tabela 3). Contudo, este herbicida alterou o metabolismo dos animais expostos, que apresentaram redução protéica no tecido branquial (exceto para 5 $\mu\text{g/L}$ de Primoleo[®], Fig. 9-A) e aumento na síntese de glicogênio renal e muscular em diferentes concentrações (Fig. 10-C e 10-D). As reservas de gordura também foram alteradas significativamente, observando-se o consumo de lipídeos totais em quatro situações: na segunda concentração, no tecido hepático (Fig. 11-B); na terceira concentração, no tecido renal (Fig. 11-C); e nestas mesmas duas concentrações, no tecido muscular (Fig. 11-D). Os triacilgliceróis mostraram-se significativamente elevados em todos os tecidos (Fig. 12), frente à exposição às três primeiras concentrações; exceto para o tecido muscular, que obteve elevação em todas as concentrações testadas para o Primoleo[®], sendo este incremento inversamente proporcional à concentração do agroquímico (Fig. 12-D).

Quando expostos ao Facet[®], os tecidos hepático e muscular mostraram ser os mais sensíveis a este tóxico, apresentando elevações nos níveis de proteínas no fígado na segunda concentração (Fig. 9-B); aumento no estoque de glicogênio muscular na concentração mais alta (Fig. 10-D); síntese de lipídeos totais no fígado, também na quarta concentração (Fig. 11-B), e na segunda e terceira concentrações, no tecido muscular (Fig. 11-D). Os níveis de triacilgliceróis foram elevados na concentração mais baixa, no tecido hepático (Fig. 12-B) e sofreram redução no tecido muscular, na segunda concentração (Fig. 12-D). O tecido branquial alterou apenas seus níveis de proteínas, que foram deplecionados nas concentrações de 1,75 e 7 $\mu\text{g/L}$ de Facet[®]. A enzima SOD teve sua atividade aumentada nos tecidos hepático (na segunda concentração) e muscular (na terceira concentração) (Tabela 3). Porém, os tecidos branquial, renal e muscular mostram um incremento do TBARS, nas

concentrações extremas (Tabela 3). A enzima CAT não mostrou-se alterada em nenhuma situação experimental, com este agroquímico (Tabela 3).

Discussão

Os peixes possuem a capacidade de reter, por processos ativos e passivos, os xenobióticos encontrados na água onde se encontram, sendo os parâmetros mensurados nestes animais considerados como avaliadores do potencial de poluição destes agrotóxicos (Brum et al. 2014), fato corroborado por nossos resultados. Fanta et al. (2003) concluíram, em seu trabalho com *Corydoras paleatus* que, mesmo em ambiente com concentrações subletais consideradas seguras de um agroquímico organofosforado (Folidol 600[®]), estes tóxicos não podem ser usados de maneira indiscriminada apenas por não serem letais, pois os indivíduos expostos podem adoecer, apresentando alterações morfológicas e/ou bioquímicas em seu organismo. Conforme o esperado, nenhum peixe morreu durante o procedimento experimental deste trabalho, confirmando que todas as concentrações utilizadas são subletais aos peixes da espécie *Rhamdia quelen*.

Para Paulino et al. (2012) as brânquias desempenham um papel importante na regulação iônica, no equilíbrio ácido-base, na excreção de nitrogênio e na hematose. Fanta et al. (2003) também explicam que este órgão é responsável por absorver os agroquímicos dissolvidos na água, e os compostos lipossolúveis; assim, os organofosforados conseguem, sem dificuldade, atravessar o sistema de membranas das células, intoxicando estas e, conseqüentemente, causando danos estruturais. Os poluentes afetam não apenas a parte externa do tecido branquial, mas também a membrana basal, via sistema circulatório, causando assim maior dano nas lamelas das brânquias dos peixes mantidos em águas contaminadas (Fanta et al. 2003), reduzindo a permuta de gases (O₂ e CO₂) e causando um desequilíbrio iônico e ácido-básico (Paulino et al. 2012).

Nas situações experimentais deste trabalho, os três herbicidas em questão afetaram significativamente a concentração de proteínas do tecido branquial, possivelmente na busca de suprir a demanda energética, sendo este metabólito considerado um dos principais alvos para a elucidação dos efeitos de pesticidas em várias espécies de peixes (Toni et al. 2013), podendo o catabolismo de proteínas indicar uma estratégia fisiológica do peixe para compensar a situação de estresse. Com respostas bioquímicas similares a encontrada em nosso trabalho, Fernández-Vega et al. (2002) também observaram hipoproteinemia em brânquias de peixes *Anguilla anguilla* expostos ao herbicida Molinate[®], tanto no período de exposição ao agroquímico como nas horas que seguiram em recuperação em água não contaminada. Pretto et al. (2011) afirmam que uma hipótese para esta resposta bioquímica seja uma hipoproteinemia generalizada, observada nos tecidos de peixes após o estresse por agentes tóxicos, relacionada a um distúrbio na osmorregulação.

O herbicida Roundup[®] ainda provocou redução no glicogênio e lipídeos totais das brânquias, em especial na concentração de 72 µg/L, quando estes três metabólitos foram deplecionados. Para justificar este grande gasto energético cabe lembrar que as brânquias representam a interface direta do animal com o meio ambiente, atuando como primeiro órgão a tentar reparar ou impedir o dano provocado pelas Espécies Reativas de Oxigênio, produzidas pelos mecanismos de defesa contra o poluente, segundo Livingstone (2001), além de necessitarem de uma síntese elevada de ATP para manterem tanto o balanço oxidativo como a produção da excreta nitrogenada (Souza-Bastos & Freire 2009).

Paulino et al. (2012) explicitam em seu trabalho que a exposição à atrazina afeta as defesas antioxidantes em peixes, causando um desequilíbrio entre a produção de EROS e a sua eliminação, resultando

em estresse oxidativo e dano tecidual. Contudo, o Primoleo[®] (atrazina) não provocou stress oxidativo em nenhum tecido dos indivíduos por nós testados, concordando com os resultados publicados por Paulino et al. (2012), para exposição crônica (por 14 dias) a concentrações de 2 e 25 µg/L de atrazina, analisando o tecido branquial do peixe *Prochilodus lineatus*. Os mesmos autores ainda detectaram stress oxidativo nos indivíduos expostos apenas à concentração de 10 µg/L de atrazina, com ativação de todas as enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase e glutathione S-transferase). Nossos resultados ainda concordam com o trabalho referido, visto que a catalase foi a única enzima com atividade aumentada frente à exposição as três concentrações, porém do herbicida Roundup[®] (glifosato), sendo capaz de impedir o aumento da lipoperoxidação no tecido branquial e, para os autores, quando os níveis intracelulares de H₂O₂ estão elevados, faz-se necessária maior quantidade de catalase, a enzima que reduz o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Paulino et al. 2012). Outros mecanismos de defesa podem estar envolvidos, como o citocromo P-450 que é considerada a principal via de biotransformação em animais por Foster et al. (1980), visto que não houve uma resposta dose-dependente na ativação das enzimas SOD e CAT, sugerindo que a resposta do tecido branquial à atrazina é complexa, como também observado por Paulino et al. (2012). Estes autores ainda sugerem que a baixa sensibilidade do tecido branquial à atrazina pode ser devido a rápida transferência do agroquímico das brânquias para o sangue.

Frente ao herbicida Facet[®], o tecido branquial dos juvenis de *Rhamdia quelen* sofreu estresse oxidativo, nas concentrações extremas (1,75 e 14 µ/L, Tabela 3), sem a ativação de nenhuma das enzimas antioxidantes analisadas. Segundo Oruç & Usta (2007) e Thomaz et al. (2009), a atividade das enzimas antioxidantes pode ser aumentada ou inibida pela exposição a xenobióticos, dependendo da intensidade e da duração da exposição aplicada, bem como a susceptibilidade das espécies expostas. Assim, acreditamos que o Facet[®] deva ter inibido a SOD e a CAT, acarretando em dano imediato no tecido branquial, visto que tanto a SOD quanto a CAT são enzimas-chave no sistema antioxidante, que trabalham para manter as baixas concentrações e o estado de equilíbrio das EROS (Thomaz et al. 2009).

O fígado dos peixes expostos a pesticidas sofre também alterações morfológicas, devido à intoxicação provocada por organofosforados, pois este órgão é responsável pela biotransformação dos agroquímicos em metabólitos, através de enzimas, a partir da fração solúvel de mitocôndrias e microsossomos, podendo tornar muitas vezes o metabólito em uma molécula mais tóxica do que o produto original (Fanta et al. 2003). Podemos sugerir que estudos futuros sejam realizados, visando a análise de alterações morfológicas neste órgão frente às mesmas concentrações. Isto porque, em relação aos nossos resultados, não encontramos em nenhum metabólito, nem em nenhuma situação experimental respostas dose-dependentes, como sugerem Jin et al. (2010) em seu trabalho com zebrafish (*Danio rerio*), onde afirmam que o tecido hepático responde rapidamente a atrazina, exibindo uma resposta dose-dependente. Houve alterações metabólicas frente aos três herbicidas testados, porém sem não mostraram uma relação de dose-dependência; verificando-se apenas um aumento da atividade da enzima SOD quando expostos à 3,5 µg/L de Facet[®], sendo esta suficiente para a neutralização das EROS produzidas, não havendo assim dano oxidativo neste tecido. Podemos constatar uma relação de dose-dependência apenas na atividade na catalase branquial, já discutida anteriormente.

Um aumento das proteínas totais, sugerindo um incremento da síntese e/ou diminuição do catabolismo foi observado no fígado dos animais expostos às concentrações extremas de Roundup[®] e na concentração de 3,5 µg/L de Facet[®]. Senhorin et al. (2014) mostraram resultados similares ao encontrados neste trabalho, onde observaram um aumento significativo nos níveis protéicos do fígado de indivíduos de bagre-surubim expostos ao

mesmo agroquímico, porém à concentrações de 7,5 e 15 mg/L. Os autores acreditam que este aumento pode estar relacionado à reparação das células hepáticas devido à ação tóxica do agente, representando uma resposta adaptativa contra uma possível perda de proteínas dos tecidos após a exposição, conduzindo assim a um aumento da síntese de proteínas hepáticas. Pretto et al. (2011) também encontraram aumento neste metabólito, quando analisaram o fígado de *Leporinus obtusidens* expostos à 204 µg/L de Facet[®], concluindo que esta síntese deva indicar um reparo das células danificadas ou para compensar as enzimas perdidas devido aos danos celulares. Estes resultados são opostos ao encontrado por Toni et al. (2011), que observaram um decréscimo nos níveis de proteínas no corpo de carpas expostas ao fungicida tebuconazole por 96 horas. Estas diferenças podem ser atribuídas ao tempo de exposição, a diferentes respostas dos organismos frente ao agroquímico testado, por tratarem-se de espécies distintas, ou ainda por diferentes respostas teciduais, visto que os autores realizaram suas análises com um homogeneizado produzido com o corpo inteiro do peixe, somando assim as respostas particulares de cada tecido.

Herbicidas como a atrazina (Primoleo[®]) são rapidamente absorvidos pelo trato gastrointestinal, sendo distribuído pelos rins e pelo fígado (Dong et al. 2009). Corroborando com os autores, encontramos o tecido renal como o mais alterado por este agroquímico.

Podemos sugerir um padrão de acúmulo de reservas na forma de triacilgliceróis em todos os tecidos dos peixes expostos ao herbicida Primoleo[®] e ao herbicida Facet[®] no tecido hepático. Aliado ao aumento dos triacilgliceróis, foi detectado uma diminuição dos lipídeos totais nas concentrações intermediárias de Primoleo[®] (5 e 10 µg/L), exceto no tecido branquial, que não alterou suas reservas lipídicas nesta situação experimental. Também foram deplecionados os lipídeos totais nos tecidos hepático e renal dos indivíduos expostos às concentrações do Roundup[®], sendo estas as únicas alterações bioquímicas sofridas pelo tecido renal frente a este último agroquímico. Visto que os triacilgliceróis tiveram suas reservas mantidas ou aumentadas e este encontra-se como parte dos lipídeos totais que apresentaram-se diminuídos, podemos supor que nesta situação estressante tenha sido utilizado lipídeos polares. Os lipídeos polares como o colesterol são principalmente componentes estruturais da membrana plasmática e utilizados para a síntese de hormônios como os glicocorticóides (Stuck et al. 1996). Sabe-se que, para que os níveis plasmáticos de um metabólito aumentem, faz-se necessária sua síntese tecidual e/ou sua maior absorção no trato gastrointestinal; sendo assim, podemos propor que este aumento possa ser consequência da alocação do trato gastrointestinal para outros tecidos, para que estes órgãos possam reparar danos sofridos em sua membrana plasmática. Portanto, o que observamos neste discorda do publicado por Sinhoin et al. (2014), que detectaram uma redução significativa nos níveis de colesterol no plasma do bagre-surubim exposto a concentrações entre 2,25 e 15 mg/L de Roundup[®]; apesar da grande diferença nas concentrações às quais os animais foram expostos, visto, no presente estudo, utilizamos concentrações bem menores. Estudos futuros devem ser desenvolvidos visando elucidar o padrão de comportamentos alimentares de peixes expostos a estes agroquímicos.

Observou-se também um aumento de glicogênio nos tecidos renal (frente ao Primoleo[®]) e muscular (nos experimentos com os três agroquímicos). Becker et al. (2009) explicam em seu trabalho que os padrões de resposta do glicogênio parecem ser específicos, de acordo com o agroquímico e com o tecido considerado; o que pode explicar o perfil de resposta encontrado em nosso estudo para este polissacarídeo nos rins e músculo caudal, frente aos resultados da literatura e considerando as baixas concentrações de agroquímicos às quais os animais foram expostos. Os autores compararam dois locais com indivíduos de *Rhamdia quelen*, sendo um

preservado e outro com alta atividade antrópica. Os peixes do sítio altamente antropizado apresentaram níveis inferiores de glicogênio renal, e os autores sugerem que a tensão pela modificação do ambiente é acompanhada pela rápida degradação de glicogênio, provavelmente, para ajudar a manter a energia no processo metabólico. Isto nos permite sugerir que o alto custo energético no tecido renal esteja relacionado à metabolização e/ou excreta deste xenobiótico. Os resultados destes autores concordam com o encontrado por Menezes et al. (2014), que trabalharam com a mesma espécie de peixe, porém expostos à uma formulação comercial de ácido 2,4-diclorofenoxiacético [sal 2,4-D dimetilamina (DMA)], observando uma redução do glicogênio em ambos os tecidos citados. Ainda, Sancho et al. (1997) não detectaram alterações nos níveis de glicogênio hepático e muscular do peixe *Anguilla anguilla* exposto a concentrações subletais de um inseticida organofosforado.

Alterações nos produtos das reações químicas normais do metabolismo aeróbico podem ser resultado do estresse oxidativo, pois as EROS clivam ligações peptídicas, modificando os resíduos dos aminoácidos, as reações de peptídios e lipídeos (principalmente os formadores da membrana plasmática), os produtos da oxidação dos carboidratos, a oxidação dos grupos sulfidril e a formação de proteína carbonil (Lushchak & Bagnyukova 2006). As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) indicam a intensidade da peroxidação lipídica, pois o malondialdeído (que participa da reação com o ácido tiobarbitúrico) é um dos produtos finais da peroxidação lipídica. Assim, avaliamos a quantidade deste produto final para determinar se há ou não intensa peroxidação lipídica (Lushchak & Bagnyukova 2006). Os níveis de TBARS mostraram-se elevados quando os indivíduos foram expostos à 14 µg/L de Facet[®], sinalizando estresse oxidativo no tecido renal, frente à interação com o agroquímico. Cabe destacar que, como ocorreu também no tecido branquial dos indivíduos expostos ao mesmo xenobiótico, às enzimas do SOD e CAT não foram ativadas. Pretto et al. (2011) explicitam que o estresse oxidativo induzido por herbicidas ou surfactantes, presentes em sua formulação ou associados a estes, pode suprimir a atividade das enzimas antioxidantes, supressão esta devido a danos oxidativos e/ou a perda de mecanismos compensatórios. Opostamente, quando expostos à concentração mais elevadas de Primoleo[®] (15 µg/L), os níveis de TBARS reduziram-se significativamente, sugerindo que o sistema enzimático da SOD e da CAT foram capazes de responder a esta provocação e neutralizar as EROS formadas, mesmo sem alterar-se significativamente, podendo supor que outros componentes de metabolização de xenobióticos foram ativados. Resultado similar, de redução no TBARS (porém no tecido muscular), foi relatado por Moraes et al. (2007), após expor indivíduos da espécie *Leporinus obtusidens* a concentrações de 0,375 mg/L de Facet[®], por 30 dias. Estudos futuros visando ampliar os mecanismos de ação destes pesticidas em organismos não-alvo, como o *Rhamdia quelen*, e sua ação sobre o sistema antioxidante enzimático e não enzimático devem ser realizados.

A exceção encontrada neste estudo foi a reação dos tecidos hepático e muscular dos peixes expostos ao agroquímico Facet[®], pois foram as únicas duas situações experimentais onde encontrou-se uma elevação nos níveis lipídicos, combinadas com a manutenção dos níveis de triacilgliceróis ou a depleção destes, ocorrida no tecido muscular. Landys et al. (2005) afirmam que, em situações de aumento da demanda de energia, como situações de stress, os animais podem obter energia através de lipídeos armazenados como triglicerídeos. Ainda, mais estudos devem ser realizados buscando analisar este metabólito nos peixes, especialmente na área da toxicologia, para que possa tornar-se mais uma ferramenta às análises ambientais.

Os radicais livres atuam sobre as membranas biológicas, pois estas são ricas em lipídeos (em especial os ácidos graxos poliinsaturados), causando assim a lipoperoxidação (Oruç & Usta 2007). No músculo (para 1,75

µg/L de Facet[®]), nenhuma enzima estudada mostrou uma atividade aumentada, tendo assim uma elevação da lipoperoxidação, sem alteração na atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT. Toni et al. (2013) também encontraram aumento significativo da lipoperoxidação no fígado e no músculo do peixe *Cyprinus carpio*, à concentração de 344,6 µg/L de Facet[®], sendo que o tecido hepático apresentou alterações desde o 7º dia de exposição, enquanto que o tecido muscular mostrou-se alterado apenas a partir de 30 dias de interação com o agroquímico. No presente estudo, as concentrações utilizadas foram bem inferiores as dos autores citados anteriormente, em especial a concentração mais baixa (1,75 µg/L), sendo a única situação experimental na qual o tecido muscular sofreu lipoperoxidação. Frente ao mesmo agroquímico, na concentração de 7 µg/L, a enzima SOD apresentou-se aumentada, promovendo a neutralização das EROS produzidas pela interação com o herbicida. Já a exposição ao Roundup[®] conduziu a um incremento da enzima CAT, que também mostrou-se eficaz na remoção das EROS, por não haver alteração na medida de lipoperoxidação. Frente ao Primoleo[®], o tecido muscular não alterou o nível de atividade de suas enzimas antioxidantes, tampouco os níveis de lipoperoxidação.

Conclusões

Em exposição aos três agrotóxicos testados, a composição bioquímica tecidual dos juvenis de *R. quelen* sofreu alterações significativas. Tais alterações podem acarretar a danos principalmente no tecido branquial; considerando seu papel funcional ligado às trocas gasosas com o ambiente e à manutenção do equilíbrio osmótico, estas alterações poderão conduzir a uma perda da homeostase, podendo acarretar na morte dos animais e/ou a diminuição do sucesso reprodutivo, quando expostos cronicamente a estas substâncias e nestas concentrações, que são semelhantes às encontradas em ambiente natural. Os indivíduos de *R. quelen* parecem conseguir modular suas enzimas a ponto de não sofrerem dano oxidativo frente aos herbicidas Roundup[®] e Primoleo[®]; porém, o herbicida Facet[®] (ainda sem regulamentação de uso no Brasil) mostrou-se capaz de agredir significativamente os indivíduos juvenis desta espécie, principalmente nos tecidos branquial, renal e muscular. Pode-se sugerir, com base neste trabalho, uma revisão na legislação brasileira, a fim de modificar a concentração permitida de glifosato e atrazina no ambiente natural, bem como a inclusão do quinclorac nestas regulamentações.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pelas bolsas de apoio concedidas.

Conflitos de interesse

Não há.

Referências

- ALBINATI, A. C. L. et al. Biomarcadores histológicos - toxicidade crônica pelo Roundup em piaçu (*Leporinus macrocephalus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 3, p. 621–627, 2009.
- AMINOV, A. I.; GOLOVANOV, I. L.; FILIPPOV, A. A. Effect of the herbicide Roundup on the activity of Glycosidases of invertebrates and juvenile fish. **Inland Water Biology**, v. 6, n. 4, p. 351–356, 30 jan. 2014.
- ANNETT, R.; HABIBI, H. R.; HONTELA, A. Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. **Journal of Applied Toxicology**, v. 34, n. 5, p. 458–479, maio 2014.

- AZEVEDO, V. C. Efeito da exposição à atrazina nas brânquias de *Poecilia vivipara* aclimatados a diferentes salinidades. **Universidade Federal de São Carlos**, Dissertação de Mestrado, 2013.
- BALDISSEROTTO, B.; NETO, J. R. **Criação de Jundiá**. Santa Maria: Ed. UFSM, p. 232, 2004.
- BALLESTEROS, M. L.; WUNDERLIN, D. A.; BISTONI, M. A. Oxidative stress responses in different organs of *Jenynsia multidentata* exposed to endosulfan. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 1, p. 199–205, jan. 2009.
- BARCELLOS, G. et al. Haematological and biochemical characteristics of *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard Pimelodidae): changes after acute stress. **Aquaculture Research**, v. 34, p. 1465–1469, 2003.
- BECKER, A. G. et al. Pesticide contamination of water alters the metabolism of juvenile silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 6, p. 1734–1739, set. 2009.
- BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. **Biochemistry Journal**, v. 134, p. 707–716, 1973.
- BRUM, A. et al. Hematological and histopathological changes in silver catfish *Rhamdia quelen* (Siluriformes) exposed to clomazone herbicide in the Madre River, Santa Catarina State, Southern Brazil. **Journal of environmental science and health. Part. B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes**, v. 49, n. 3, p. 169–75, jan. 2014.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipids peroxidation. **Methods Enzymology**, v. 52, p. 302–310, 1978.
- CANADIAN COUNCIL OF MINISTERS OF THE ENVIRONMENT. Canadian water quality guidelines for the protection of agricultural water uses: Atrazine. In: **Canadian environmental quality guidelines**. Winnipeg: Manitoba Statutory Publications, p. 1–3. 1999.
- CERICATO, L. et al. Cortisol response to acute stress in jundiá *Rhamdia quelen* acutely exposed to sub-lethal concentrations of agrichemicals. **Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology**, v. 148, n. 3, p. 281–286, set. 2008.
- CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE-CONAMA. **Resolução No 357, de 17 de março de 2005** Ministério Do Meio Ambiente, 2005.
- DESCHAMPS, F. C.; MARSCHALEK, R.; KLEVESTON, R. **Agrotóxicos Na Água Superficial Sugerem Melhorias**, VIII Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado. **Anais...**Santa Maria: 2013
- DONG, X. et al. Effects of atrazine on cytochrome P450 enzymes of zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 77, n. 3, p. 404–412, out. 2009.
- FANTA, E. et al. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 54, n. 2, p. 119–130, 2003.
- FAUSCH, K. D. et al. **Fish communities as indicators of environmental degradation**American Fisheries Society Symposium 8. **Anais...**1990
- FERNÁNDEZ-VEGA, C. et al. Thiobencarb-Induced Changes in Acetylcholinesterase Activity of the Fish *Anguilla anguilla*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 72, n. 1, p. 55–63, jan. 2002.
- FERREIRA, D. et al. Assessment of oxidative stress in *Rhamdia quelen* exposed to agrichemicals. **Chemosphere**, v. 79, n. 9, p. 914–921, maio 2010.
- FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A Simple Method For The Isolation And Purification Of Total Lipides From Animal Tissues. **The Journal of biological chemistry**, v. 226, p. 497–509, 1957.
- FRINGS, C.; DUNN, R. A colorimetric method for determination of total serum lipids based on the sulfophosphovanillin reaction. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 53, p. 89–91, 1970.
- GIESY, J. P.; DOBSON, S.; SOLOMON, K. R. Ecotoxicological Risk Assessment for Roundup Herbicide. **Rev. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 167, p. 35–120, 2000.
- GOMES, L. DE C. et al. Biologia do Jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). p. 179–185, 2000.
- HUED, A. C.; BISTONI, M. D. L. A. Development and validation of a Biotic Index for evaluation of environmental quality in the central region of Argentina. **Hydrobiologia**, v. 543, n. 1, p. 279–298, jul. 2005.
- JIN, Y. et al. Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposure in adult female zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 78, n. 7, p. 846–52, fev. 2010.
- LANDYS, M. M. et al. Metabolic profile of long-distance migratory flight and stopover in a shorebird. **Proceedings of The Royal Society B**, v. 272, p. 295–302, 7 fev. 2005.
- LIVINGSTONE, D. R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. **Marine pollution bulletin**, v. 42, n. 8, p. 656–66, ago. 2001.
- LUSHCHAK, V. I.; BAGNYUKOVA, T. V. Effects of different environmental oxygen levels on free radical processes in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology - B**, v. 44, p. 283–289, 2006.
- MENEZES, C. C. et al. Roundup effects on oxidative stress parameters and recovery pattern of *Rhamdia quelen*. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 60, n. 4, p. 665–71, maio 2011.
- MENEZES, C. et al. Herbicide clomazone effects on δ -aminolevulinic acid activity and metabolic parameters in *Cyprinus carpio*. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 92, n. 4, p. 393–8, abr. 2014a.
- MENEZES, C. et al. Commercial formulation containing 2,4-D affects biochemical parameters and morphological indices of silver catfish exposed for 90 days. **Fish physiology and biochemistry**, 12 set. 2014b.

- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria MS No 518, de 25 de março de 2004** Brasil, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, 2004.
- MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. J. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **Biol. Chem.**, v. 247, n. 10, p. 3170–3175, 1972.
- MORAES, B. S. et al. Effects of four rice herbicides on some metabolic and toxicology parameters of teleost fish (*Leporinus obtusidens*). **Chemosphere**, v. 68, n. 8, p. 1597–601, jul. 2007.
- MOURA, E. E. S. DE. Determinação da toxicidade aguda e caracterização de risco ambiental do herbicida roundup (glifosato) sobre três espécies de peixes. **Universidade Federal do Rio Grande Do Norte**, Dissertação de Mestrado, 2009.
- ORUÇ, E. Ö.; USTA, D. Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential of diazinon in different tissues of *Cyprinus carpio*. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 23, n. 1, p. 48–55, jan. 2007.
- PAULINO, M. G.; SAKURAGUI, M. M.; FERNANDES, M. N. Effects of atrazine on the gill cells and ionic balance in a neotropical fish, *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**, v. 86, n. 1, p. 1–7, jan. 2012.
- PAULINO, M. G.; SOUZA, N. E. S.; FERNANDES, M. N. Subchronic exposure to atrazine induces biochemical and histopathological changes in the gills of a Neotropical freshwater fish, *Prochilodus lineatus*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 80, n. 1, p. 6–13, jun. 2012.
- PRETTO, A. et al. Commercial formulation containing quinclorac and metsulfuron-methyl herbicides inhibit acetylcholinesterase and induce biochemical alterations in tissues of *Leporinus obtusidens*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 74, n. 3, p. 336–41, mar. 2011.
- QUEIROZ, G. M. P. et al. Transporte De Glifosato Pelo Escoamento Superficial E Por Lixiviação Em Um Solo Agrícola. **Química Nova**, v. 34, n. 2, p. 190–195, 2011.
- REIS, R. E.; KULLANSER, S. O.; FERRARIS JR., C. J. **Check list of the freshwater fishes of south and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003.
- RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia de Herbicidas**. 5ª ed. ed. Londrina: IAPAR, p. 648pp. 2005.
- ROUSTAN, A. et al. Genotoxicity of mixtures of glyphosate and atrazine and their environmental transformation products before and after photoactivation. **Chemosphere**, v. 108, p. 93–100, ago. 2014.
- SANCHO, E.; FERRANDO, M. D.; ANDREU, E. Sublethal Effects of an Organophosphate Insecticide on the European Eel, *Anguilla anguilla*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 36, n. 1, p. 57–65, 1997.
- SANTOS, T. G.; MARTINEZ, C. B. R. Atrazine promotes biochemical changes and DNA damage in a Neotropical fish species. **Chemosphere**, v. 89, n. 9, p. 1118–25, nov. 2012.
- SHARMA, R. M. Effect of endosulfan on acid and alkaline phosphatase activity in liver, kidney, and muscles of *Channa gachua*. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 44, n. 3, p. 443–8, mar. 1990.
- SHIOGIRI, N. S. et al. Acute exposure of a glyphosate-based herbicide affects the gills and liver of the Neotropical fish, *Piaractus mesopotamicus*. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 34, n. 2, p. 388–96, set. 2012.
- SINHORIN, V. D. G. et al. Metabolic and behavior changes in surubim acutely exposed to a glyphosate-based herbicide. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 67, n. 4, p. 659–67, 22 nov. 2014.
- SOSO, A. B. et al. Chronic exposure to sub-lethal concentration of a glyphosate-based herbicide alters hormone profiles and affects reproduction of female Jundiá (*Rhamdia quelen*). **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 23, n. 3, p. 308–13, maio 2007.
- SOUZA-BASTOS, L. R.; FREIRE, C. A. The handling of salt by the neotropical cultured freshwater catfish *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, v. 289, n. 1-2, p. 167–174, abr. 2009.
- STUCK, K. C. et al. Relationship between BP (*Baculovirus penaei*) and energy reserves in larval and postlarval Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 24, n. 3, p. 191–198, 1996.
- THOMAZ, J. M. et al. Cardio-respiratory function and oxidative stress biomarkers in Nile tilapia exposed to the organophosphate insecticide trichlorfon (Neguvon®). **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 72, n. 5, p. 1413–24, jul. 2009.
- TOMLIN, C. **The pesticide manual - incorporating the agrochemicals handbook**. 10ª ed. Cambridge: British Council, p. 1341. 1994.
- TONI, C. et al. Assessment of oxidative stress and metabolic changes in common carp (*Cyprinus carpio*) acutely exposed to different concentrations of the fungicide tebuconazole. **Chemosphere**, v. 83, n. 4, p. 579–84, abr. 2011.
- TONI, C. et al. Oxidative stress in carp exposed to quinclorac herbicide under rice field condition. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 92, p. 27–31, jun. 2013.
- VAN HANDEL, E. Estimation of glycogen in small amounts of tissue. **Analytical biochemistry**, v. 11, n. 2, p. 256–65, maio 1965.
- ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**. 5ª ed. ed. Upper Saddle River: Pearson Prentice-Hall, p. 960. 2010.

Figuras e tabelas:

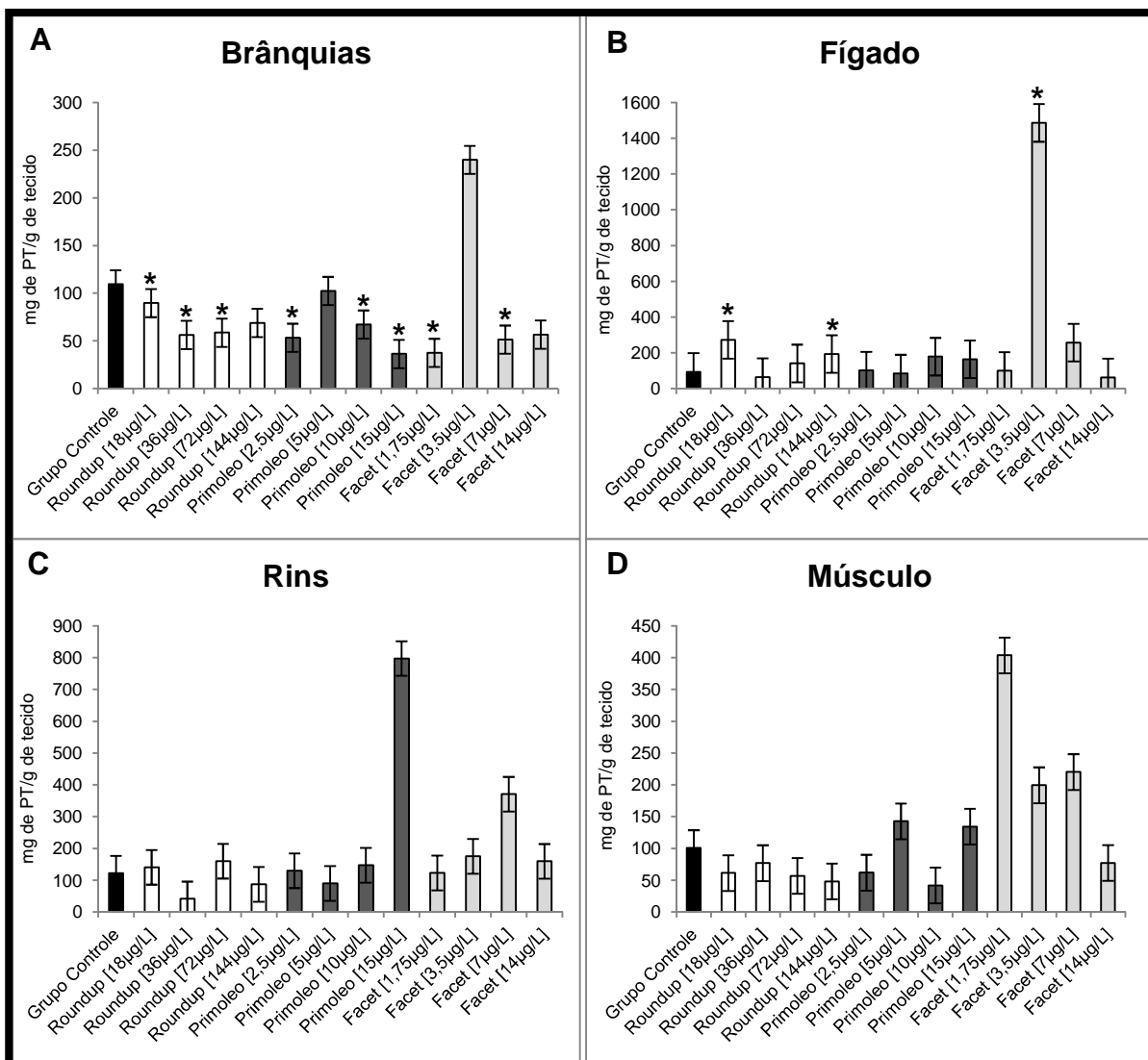


Figura 9. Resultados do metabolismo das proteínas totais (PT) nos tecidos branquial (A), hepático (B), renal (C) e muscular (D) dos alevinos de *Rhamdia quelen*, expressos em média \pm erro padrão. O símbolo (*) identifica as diferenças significativas em relação ao grupo controle, com valor de $p < 0,05$.

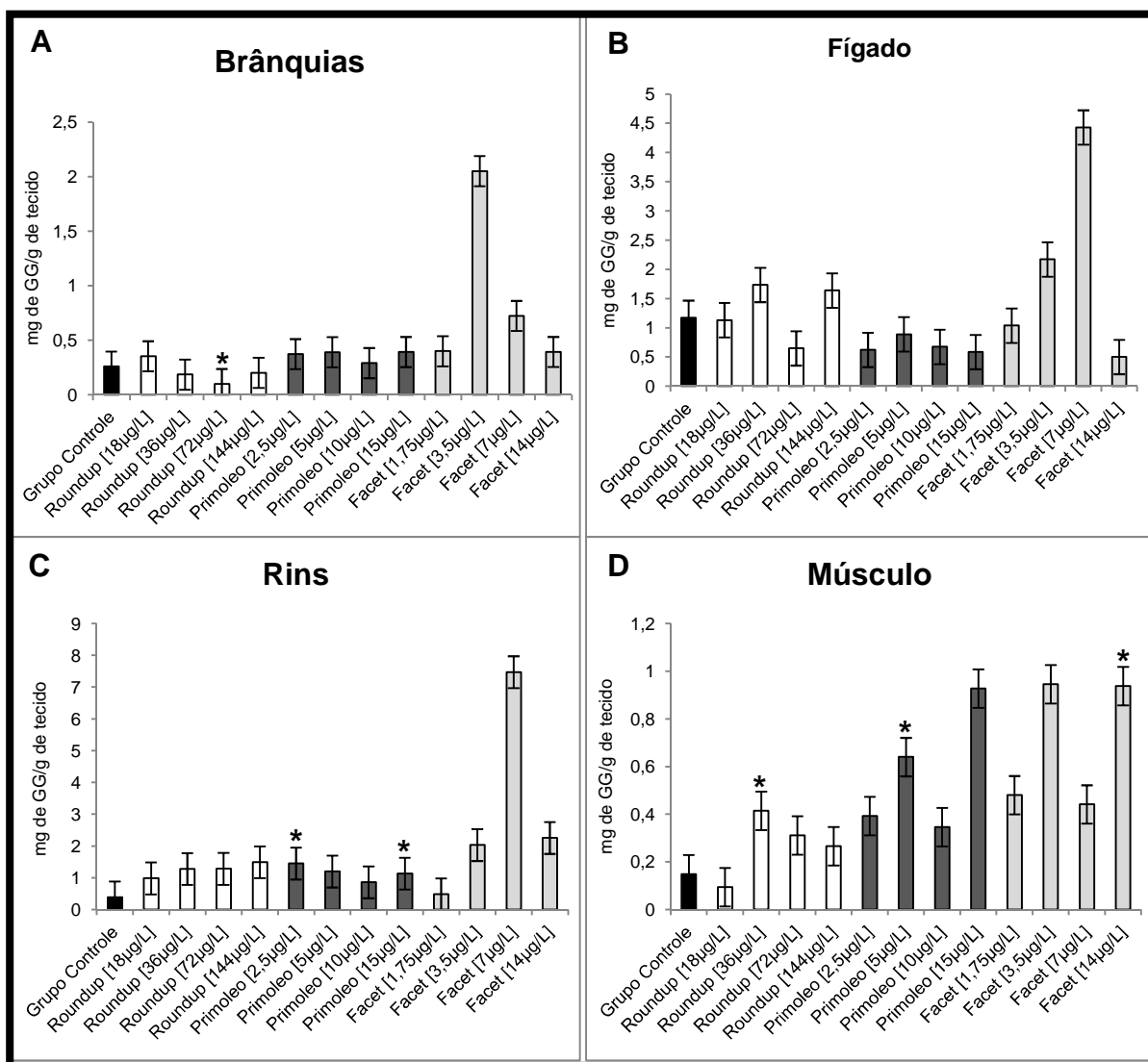


Figura 10. Resultados do metabolismo do glicôgeno (GG) nos tecidos branquial (A), hepático (B), renal (C) e muscular (D) dos alevinos de *Rhamdia quelen*, expressos em média \pm erro padrão. O símbolo (*) identifica as diferenças significativas em relação ao grupo controle, com valor de $p < 0,05$.

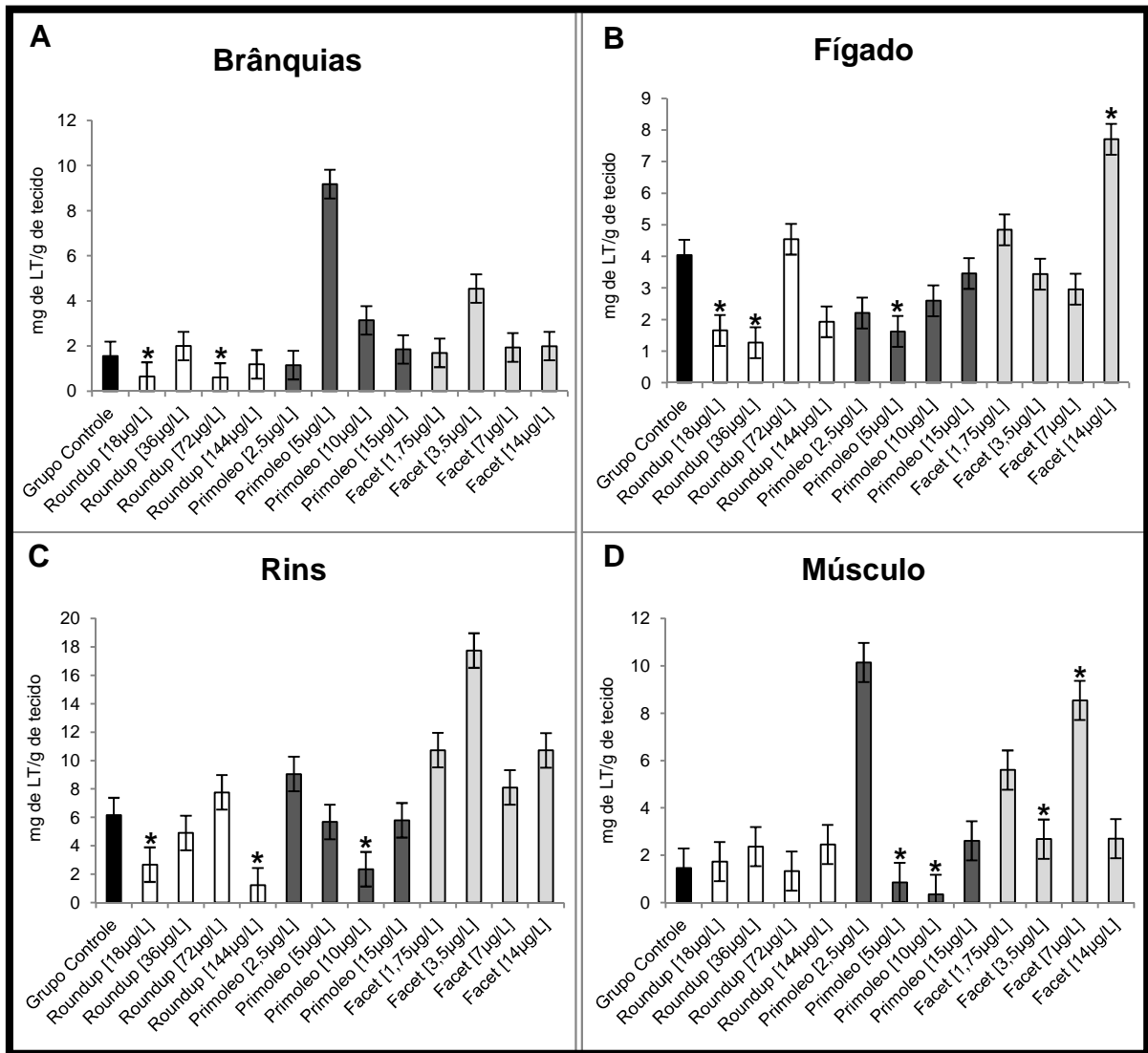


Figura 11. Resultados do metabolismo de lipídeos totais (LT), nos tecidos branquial (A), hepático (B), renal (C) e muscular (D) dos alevinos de *Rhamdia quelen*, expressos em média \pm erro padrão. O símbolo (*) identifica as diferenças significativas em relação ao grupo controle, com valor de $p < 0,05$.

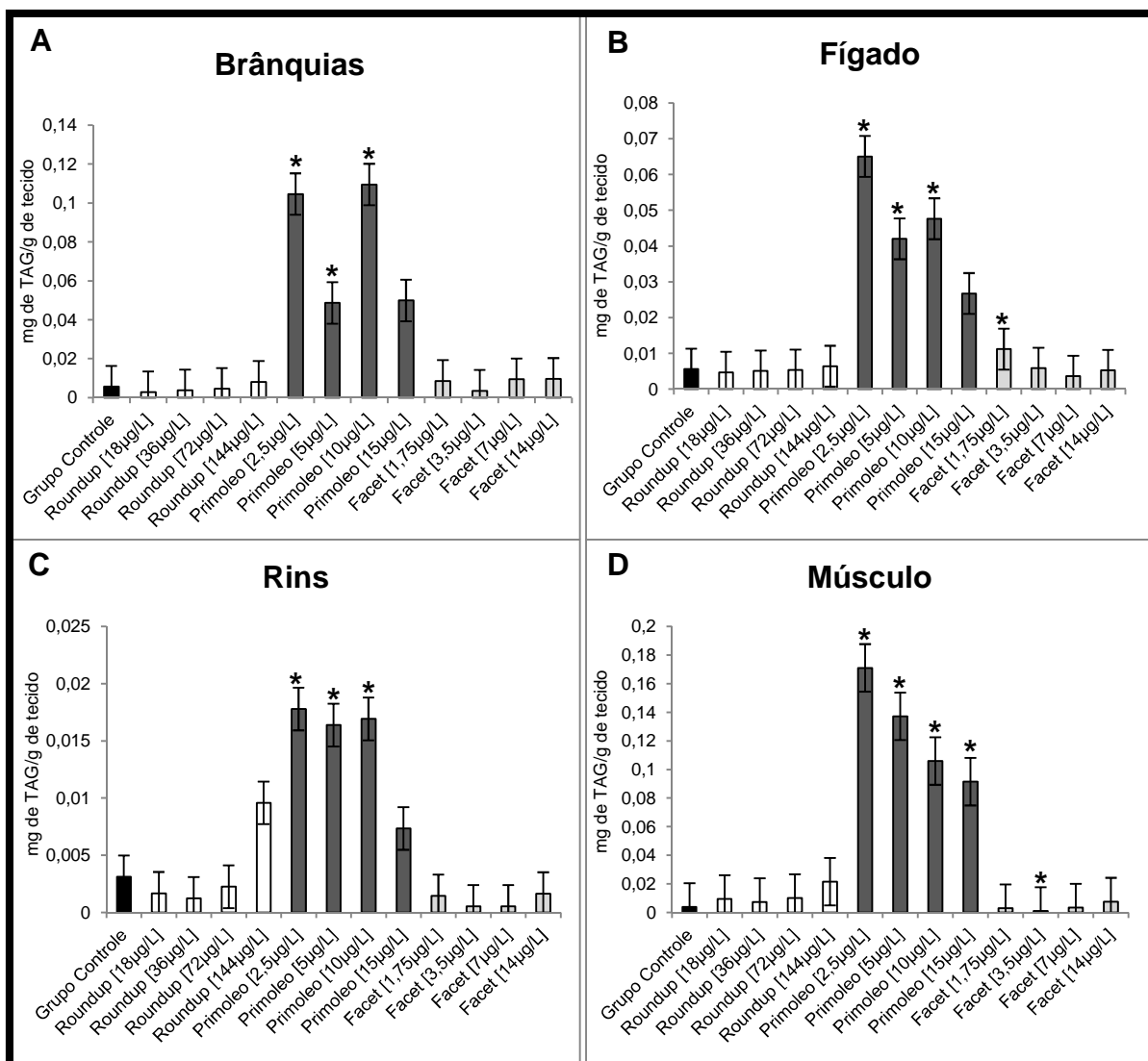


Figura 12. Resultados do metabolismo de triacilgliceróis (TAG), nos tecidos branquial (A), hepático (B), renal (C) e muscular (D) dos alevinos de *Rhamdia quelen*, expressos em média \pm erro padrão. O símbolo (*) identifica as diferenças significativas em relação ao grupo controle, com valor de $p < 0,05$.

Tabela 3. Resultados do balanço oxidativo dos alevinos de *Rhamdia quelen*. Valores de superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nos tecidos de *Rhamdia quelen* (média ± erro padrão). O símbolo (*) identifica as diferenças significativas em relação ao grupo controle, com valor de $p < 0,05$.

	Brânquias			Fígado			Rins			Músculo		
	SOD (U SOD/mg PT)	CAT (pmoles/mg PT.min)	TBARS (nm TBARS/mg PT)	SOD (U SOD/mg PT)	CAT (pmoles/mg PT.min)	TBARS (nm TBARS/mg PT)	SOD (U SOD/mg PT)	CAT (pmoles/mg PT.min)	TBARS (nm TBARS/mg PT)	SOD (U SOD/mg PT)	CAT (pmoles/mg PT.min)	TBARS (nm TBARS/mg PT)
Roundup®												
[18µg/L]	1,29 ± 0,8	13,13 ± 4,6	0,87 ± 0,1	2,19 ± 0,9	21,62 ± 6,9	0,31 ± 0,1	2,89 ± 0,9	13,74 ± 7,9	0,48 ± 0,1	7,87 ± 6,1	5,47 ± 1,1	0,84 ± 0,1
[36µg/L]	2,74 ± 0,921	27,78 ± 10,7*	0,37 ± 0,1	1,81 ± 0,7	16,65 ± 0,9	0,79 ± 0,3	4,54 ± 1,4	7,5 ± 2,1	0,81 ± 0,1	4,41 ± 2,0	16,93 ± 3,4*	0,71 ± 0,3
[72µg/L]	2,49 ± 1,2	45,03 ± 9,0*	2,84 ± 1,1	4,50 ± 1,9	41,56 ± 17,0	2,31 ± 1,3	5,02 ± 0,8	13,25 ± 4,3	1,45 ± 0,6	9,69 ± 4,3	13,41 ± 4,6	0,52 ± 0,2
[144µg/L]	1,6 ± 0,7	64,72 ± 37,3*	0,93 ± 0,1	0,64 ± 0,1	37,24 ± 11,4	0,32 ± 0,04	6,41 ± 1,1	46,94 ± 22,7	0,97 ± 0,2	2,85 ± 0,6	2,96 ± 0,9	0,81 ± 0,1
Primoleo®												
[2,5µg/L]	0,81 ± 0,1	7,58 ± 3,4	0,55 ± 0,1	3,31 ± 1,2	12,75 ± 6,0	0,53 ± 0,1	1,75 ± 0,6	6,79 ± 2,8	0,53 ± 0,09	2,01 ± 0,5	7,66 ± 4,0	0,71 ± 0,2
[5µg/L]	0,32 ± 0,1	1,14 ± 0,5	0,40 ± 0,1	3,46 ± 1,4	36,66 ± 16,2	0,72 ± 0,2	0,66 ± 0,5	3,83 ± 1,6	0,74 ± 0,3	6,93 ± 3,1	5,32 ± 2,4	2,08 ± 0,9
[10µg/L]	1,34 ± 0,3	3,69 ± 1,6	0,62 ± 0,3	1,64 ± 0,6	35,87 ± 19,7	0,21 ± 0,06	0,7 ± 0,2	5,18 ± 2,4	0,55 ± 0,2	3,47 ± 1,38	9,69 ± 4,6	1,28 ± 0,5
[15µg/L]	1,17 ± 0,4	2,26 ± 0,9	1,28 ± 0,6	1,73 ± 0,6	9,71 ± 4,4	0,28 ± 0,1	1,92 ± 1,4	10,76 ± 6,0	0,23 ± 0,07*	4,42 ± 2,5	1,26 ± 1,2	0,99 ± 0,4
Facet®												
[1,75µg/L]	5,86 ± 2,4	4,72 ± 1,5	3,72 ± 1,2*	3,50 ± 0,4	29,73 ± 7,3	1,11 ± 0,06	1,75 ± 0,3	9,71 ± 5,5	0,82 ± 0,2	4,25 ± 0,8	5,36 ± 1,8	3,55 ± 0,1*
[3,5µg/L]	7,19 ± 3,2	3,00 ± 0,8	2,69 ± 0,99	19,84 ± 6,9*	69,96 ± 14,9	15,37 ± 10,9	2,65 ± 1,2	7,38 ± 1,6	1,93 ± 0,4	9,59 ± 1,9	11,18 ± 3,0	5,25 ± 1,7
[7µg/L]	8,73 ± 3,4	3,99 ± 2,4	2,24 ± 0,5	2,56 ± 0,6	39,72 ± 14,2	0,70 ± 0,1	1,93 ± 0,6	4,76 ± 0,5	1,66 ± 0,4	10,72 ± 1,1*	8,6 ± 2,7	5,13 ± 1,7
[14µg/L]	7,75 ± 1,4	4,36 ± 1,0	7,24 ± 1,9*	20,37 ± 8,1	48,04 ± 18,9	2,56 ± 0,8	3,29 ± 1,5	11,11 ± 2,7	1,82 ± 0,1*	4,97 ± 1,9	5,79 ± 2,3	2,29 ± 0,5
Grupo Controle	1,03 ± 0,3	5,65 ± 1,9	0,64 ± 0,1	3,34 ± 1,2	54,86 ± 14,8	0,59 ± 0,2	2,74 ± 0,66	9,35 ± 2,9	0,94 ± 0,1	2,92 ± 0,8	7,16 ± 2,3	1,07 ± 0,2

CAPÍTULO 2

Alterações metabólicas em jundiás expostos à herbicidas de lavouras de arroz
(Roundup[®], Primoleo[®] e Facet[®])

1 **Alterações metabólicas em jundiás expostos à herbicidas de lavouras de arroz (Roundup[®],**
2 **Primoleo[®] e Facet[®])**

3
4 Tanilene Sotero Pinto Persch^{1,2}, Patrícia Rodrigues da Silva¹, Sarah Helen Dias dos Santos¹,
5 Betânia Souza de Freitas¹, Guendalina Turcato Oliveira^{1,2,3*}

6
7 **Resumo**

8 Foi avaliado o efeito dos herbicidas Roundup[®] (18 e 72µg/L), Primoleo[®] (10 e 15µg/L) e Facet[®] (1,75
9 e 14µg/L) sobre o metabolismo de peixes *Rhamdia quelen* já maturados sexualmente, com análises
10 nas brânquias, fígado, rins e músculo caudal. Frente aos três agroquímicos testados houve depleção
11 proteica nas brânquias; aumento no estoque de glicogênio e consumo dos triacilgliceróis hepático; e
12 alterações no estoque de glicogênio muscular. O Roundup[®] e o Primoleo[®] estimularam o acúmulo de
13 lipídeos totais no fígado e o uso desta reserva nas brânquias quando expostos ao Roundup[®] e ao
14 Facet[®]. Nos rins houve um incremento proteico frente ao Roundup[®] e ao Primoleo[®], aumento de
15 glicogênio frente ao Facet[®] e dos lipídeos totais ao Roundup[®]. O músculo foi o mais afetado pelo
16 Primoleo[®], com alteração em todos os metabólitos testados. Sugere-se que mais estudos sejam
17 desenvolvidos envolvendo o armazenamento das reservas lipídicas nos tecidos de peixes expostos
18 aos agroquímicos.

19
20 **Palavras-chave**

21 Metabolismo; *Rhamdia quelen*; glifosato; atrazina; quinclorac

22
23 **Introdução**

24 Os agrotóxicos são contaminantes aquáticos decorrentes das atividades antropogênicas,
25 tendo como principal objetivo a eliminação de alguma forma de vida, sendo, portanto, letais inclusive
26 a espécies não-alvo. Além da letalidade, alterações em diversos níveis de organização fisiológica e

¹ Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Laboratório de Fisiologia da Conservação

² Faculdade de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Zoologia

³ Bolsista de Produtividade do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq - 307303/2012-8)

*Autor Correspondente em: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Faculdade de Biociências, Laboratório de Fisiologia da Conservação; Av. Ipiranga, 6681 prédio 12-C; Porto Alegre/RS/Brazil; Tel. +55 51 3320.3545, fax: +55 51 3320.3568, e-mail guendato@pucrs.br

27 morfológica podem ser observadas como, por exemplo, em músculos, fígado, glândulas endócrinas e
28 outros tecidos ou órgãos de populações e comunidades diversas (Albinati et al., 2009).

29 Fanta et al. (2003) destacam a importância das avaliações fisiológicas em organismos
30 expostos às concentrações subletais, para que possamos compreender a capacidade de manutenção
31 das populações em ambientes contaminados. Os mesmos autores salientam que estas adaptações
32 podem ser diferenciadas de acordo com a fase do ciclo de vida de cada espécie. Santos & Martinez
33 (2012) afirmam que, quando em contato com um organismo, o agente tóxico pode ser
34 biotransformado para tornar o xenobiótico um composto menos tóxico e facilitar a sua excreção pelo
35 organismo. Assim, as análises fisiológicas (utilizando marcadores bioquímicos) podem prover
36 modificações estratégicas ao estresse causado pelo agrotóxico visando a manutenção da
37 homeostase do organismo.

38 Os tecidos dos peixes são considerados ferramentas sensíveis à exposição de estressores
39 ambientais, pois sofrem de forma nítida com estes compostos químicos (Albinati et al., 2009). Como
40 exemplos de marcadores bioquímicos podemos citar o glicogênio, amplamente estudado, pois
41 alterações nesta reserva energética podem configurar uma resposta bioquímica do animal (Bidinotto
42 et al., 1997; Sancho et al., 1998). Outro metabólito de extrema importância são as proteínas, pois
43 desempenham um papel vital na arquitetura e na fisiologia das células e o seu catabolismo
44 desencadeia a produção de energia nos peixes, podendo o seu decréscimo também ser uma
45 resposta compensatória ao estresse causado pela exposição aos herbicidas (Samanta et al., 2014).
46 Sancho et al. (2000) afirmam que a exposição a pesticidas pode acarretar em distúrbios
47 osmorregulatórios associados a alterações no aporte proteico dos tecidos dos peixes.

48 Considerando tais aspectos, este trabalho foi desenvolvido com *Rhamdia quelen* (Quoy e
49 Gaimard, 1824), uma espécie rústica, distribuída do México a Argentina (Reis et al., 2003). No Brasil,
50 o jundiá é perfeitamente adaptado às diferentes estações climáticas e às variações extremas de
51 temperatura, bem como a variações de pH, dureza, amônia e oxigênio dissolvido na água,
52 apresentando um hábito alimentar onívoro generalista (Gomes et al., 2000); possui boa aceitação
53 comercial, sendo uma espécie potencial para cultivo tanto pela pesca, quanto para a alimentação,
54 possuindo carne de sabor agradável e excelentes características para o processamento industrial
55 (Barcellos et al., 2003). Carneiro & Mikos (2005) afirmam, em seu estudo, que é possível obter
56 crescimento padrão de alevinos de jundiá fornecendo alimento apenas uma vez ao dia. Segundo

57 Baldisserotto & Neto (2004), com 16,5 cm e 17,5 cm todos os machos e fêmeas, respectivamente,
58 estão aptos para a reprodução.

59 Neste estudo foram escolhidos três herbicidas que são muito utilizados na região sul do
60 Brasil, nas suas diversas culturas, e especialmente no cultivo de arroz irrigado. O Roundup®
61 (glifosato, produzido pela Monsanto do Brasil Ltda.) é utilizado na agricultura em aplicações variáveis,
62 conforme a necessidade frente às ervas daninhas. Conforme Amarante Junior et al. (2002), o valor
63 das doses é em torno de 5 L/ha, em até quatro aplicações com períodos entre 20 e 40 dias. O
64 Primoleo® tem como princípio ativo a atrazina (fabricado pela Syngenta Proteção de Cultivos Ltda.),
65 sendo aplicado para controlar as ervas-daninhas de folha larga nos cultivo de plantas gramíneas
66 (Griboff et al., 2014), podendo ser exemplificadas pelo milho, arroz, trigo, sorgo, cevada e cana-de-
67 açúcar. Bortoluzzi et al. (2006) encontraram concentrações de 0,20 e 0,63 µg/L de atrazina
68 (Primoleo®) nas amostras de água, após o transplante de mudas de fumo. Estes dois herbicidas
69 possuem sua utilização regulamentada pela Resolução nº 357 do Conselho Nacional do Meio
70 Ambiente (CONAMA), sendo permitido o uso de até 500 µg/L de glifosato e 2 µg/L de atrazina em
71 ambiente natural. Já para o Facet® (de princípio ativo o quinclorac, fabricado pela Basf S/A) não há
72 ainda legislação brasileira dissertando sobre o seu uso. Este agroquímico pertence a uma nova
73 classe de herbicidas altamente seletivos, mimetizador de auxinas, sendo vendido na forma um pó
74 altamente solúvel; também foi desenvolvido para aplicação em áreas de gramíneas (Toni et al.,
75 2013). Marchesan et al. (2007) encontraram indícios de quinclorac quando monitoraram plantações
76 de arroz no Rio Grande do Sul; a concentração mínima encontrada no rio Vacacaí-Mirim foi de 0,48
77 µg/L enquanto a máxima foi de 6,60 µg/L.

78 Desta forma, o presente trabalho buscou verificar possíveis alterações metabólicas em
79 indivíduos de *Rhamdia quelen* recém-maturados sexualmente, frente a testes de toxicidade aguda
80 com duas concentrações subletais dos herbicidas Roundup®, Primoleo® e Facet®.

81

82 **Materiais e Métodos**

83 *Protocolo experimental*

84 Os peixes foram comprados de uma piscicultura, e passaram por um período de aclimação
85 de sete dias, com temperatura e ciclo de luz natural, em aquários com aeração constante, salinidade
86 de 0 psu, pH entre 6,7 e 7,2, protegidos de predadores e alimentados uma vez ao dia, *ad libitum*, com

87 a mesma ração comercial para peixes ministrada na piscicultura. O comprimento de maturação
88 sexual desta espécie é de 16,5 cm e 17,5 cm para machos e fêmeas, respectivamente (Baldisserotto
89 & Neto, 2004); como todos os indivíduos possuíam comprimento total acima de 18 cm, são
90 considerados, portanto, adultos recém-maturados sexualmente (chamados alevinões) e aptos à
91 reprodução.

92 Após a aclimação, os animais foram submetidos à exposição aos agroquímicos, em
93 concentrações subletais, similares às encontradas em ambiente natural. O estudo foi feito com quatro
94 grupos experimentais: grupo controle, sem interação com o químico pelos 14 dias de experimento;
95 grupo exposto ao herbicida Roundup[®], que foi subdividido em dois grupos: um exposto à
96 concentração de 18 µg/L e outro à 72 µg/L; grupo exposto ao herbicida Primoleo[®], também
97 subdividido em dois grupos, sendo expostos às concentrações de 10 µg/L e 15 µg/L; e grupo exposto
98 ao herbicida Facet[®], subdividido em dois grupos expostos às concentrações de 1,75 µg/L e 14 µg/L,
99 respectivamente.

100 Os herbicidas foram escolhidos pela sua ampla utilização nas lavouras do sul do Brasil,
101 considerando-se os valores permitidos pela legislação vigente para água potável (no caso do
102 Roundup[®] e do Primoleo[®], visto que não há legislação no Brasil regulamentando o uso do princípio
103 ativo quinclorac) e no relatado pela literatura como valores encontrados nos campos de cultivo sul-
104 brasileiros (para os três agroquímicos) (Deschamps et al., 2013; Paulino et al., 2012; Queiroz et al.,
105 2011).

106 Segundo a Portaria Brasileira nº 518/2004 do Ministério da Saúde, considera-se água potável
107 para o consumo humano mesmo àquelas que apresentem, no máximo, 0,5 mg/L de glifosato,
108 princípio ativo do Roundup[®]. Já o limite norte americano deste herbicida em água potável, publicado
109 pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) é de 700 µg/L. Queiroz et al.
110 (2011) relatam ter encontrado valores entre 0,1 e 0,7 mg/L de glifosato em águas superficiais de
111 áreas de cultivo de soja. Assim, realizamos os procedimentos experimentais com 18 µg/L e 72 µg/L
112 de Roundup[®] (formulação comercial com 36% de glifosato), estando ambos valores dentro da faixa
113 utilizada no ambiente natural e também entre os valores permitidos pela legislação vigente neste
114 país.

115 Ainda a Portaria nº 518/2004 do Ministério da Saúde do Governo Federal Brasileiro permite a
116 presença de 2 µg/L do princípio ativo do herbicida Primoleo[®] (a atrazina) na água considerada potável

117 ao consumo humano. Nos Estado Unidos, para a USEPA o valor máximo permitido deste herbicida
118 em corpos d'água é de 3 µg/L. Baseando-se no encontrado por Paulino et al. (2012), com
119 concentrações variando entre 0,2 µg/L e 1.000 µg/L nas águas adjacentes a campos tratados,
120 estipulamos os valores de 10 µg/L e 15 µg/L de Primoleo[®] (produto com 50% de atrazina) para os
121 testes com *Rhamdia quelen*.

122 Para balizar a escolha das concentrações que utilizamos do herbicida Facet[®] (quinclorac),
123 tomou-se como referência o trabalho de Deschamps et al. (2013), que encontraram em águas
124 límnicas de cultivo de arroz no sul do Estado de Santa Catarina valores entre 2,11 e 20,2 µg/L de
125 quinclorac. Desta forma, optamos pela utilização de 1,75 µg/L e 14 µg/L de Facet[®] (comercializado
126 com 75% de quinclorac). A concentração mais alta encontra-se dentro da faixa de valores encontrada
127 pelos autores, já a concentração mais baixa não. Isto porque almejamos avaliar se há efeitos
128 biológicos mesmo em concentrações extremamente baixas (consideradas subleitas e seguras aos
129 organismos não-alvo) posto que não há legislação regulamentando o uso do princípio ativo do Facet[®]
130 (quinclorac) no Brasil, mesmo sendo um agroquímico amplamente utilizado.

131 O tempo de exposição foi de sete dias, mantendo-se os mesmos parâmetros de cuidado do
132 período de aclimatação. Findo este período, foi realizada transecção de medula espinhal nos animais,
133 sendo estes pesados em balança semi-analítica (precisão de 0,1 g) e medidos com paquímetro digital
134 (precisão 0,01 cm). Separou-se os seguintes tecidos: brânquias, fígado, rins e parte do músculo
135 caudal (cerca de 1 cm²), de ambos os gêneros (machos e fêmeas). Não foi realizada distinção entre
136 os sexos para as análises dos tecidos devido à discrepância entre o número de machos e fêmeas. Os
137 tecidos foram congelados a -20°C e processados conforme a necessidade de cada protocolo para as
138 análises bioquímicas. O protocolo experimental foi autorizado pelo Comitê de Ética para o Uso de
139 Animais da PUCRS, sob registro nº 11/00276, com *n* igual a 108 animais (sendo 36 indivíduos para
140 cada hebicida, perfazendo assim uma triplicata para os três agroquímicos).

141

142 *Determinações metabólicas*

143 Após o congelamento dos tecidos a -20°C, foi realizada a pesagem para análise individual
144 dos quatro órgãos isolados (brânquias, fígado, rins e músculo), que foram homogeneizados de duas
145 maneiras distintas: uma para as análises de proteínas e glicogênio; e outra para as reservas de
146 gordura (lipídeos totais e triglicerídeos).

147 Para as medidas de proteínas totais (PT) e glicogênio (GG) os tecidos foram
148 homogeneizados com variação na quantidade de reagente básico para a digestão dos tecidos (em
149 brânquias e músculos, utilizou-se 0,8 mL de KOH 30%, já nos tecidos hepático e renal foram
150 utilizados 0,4 mL da base), a 100°C por aproximadamente 6 horas, seguindo o protocolo de extração
151 de Van Handel (1965).

152 A realização das medidas de proteínas totais (PT) foram realizadas com o uso de kit
153 comercial para proteína (Labtest[®]), após centrifugação dos homogeneizados a 3.000 rpm por 3
154 minutos. Este kit segue a reação de biureto, extremamente sensível e estável, sendo as leituras
155 realizadas em triplicata, por espectrofotometria a 545 nm, sendo os valores expressos em mg de
156 proteína/g de tecido.

157 Para analisar a quantidade de glicogênio (GG) presente nos tecidos, acrescentou-se 2 gotas
158 de Na₂SO₄ e 0,9 mL de álcool etílico absoluto aos homogeneizados, e após agitou-se e centrifugou-
159 se a 10.000 rpm, por 10 minutos, as amostras. Foram realizados dois processos de lavagens com 0,9
160 mL de álcool etílico absoluto e 0,4 mL de água destilada, com centrifugação por mesmo tempo e
161 rotação da etapa anterior, descartando-se o sobrenadante. O precipitado foi ressuspenso em 0,3 mL
162 de água destilada, seguindo de uma hidrólise ácida com 0,1 mL de HCl 4N em 0,1 mL da suspensão
163 amostral, aquecida a 100°C por uma hora, e o processo de neutralização com 0,1 mL de Na₂CO₃ a
164 2M. Com medições espectrofotométricas em triplicata, determinou-se a quantidade de glicogênio nos
165 tecidos com o kit Glicose PAP da Labtest[®] (que baseia-se no método da glicose oxidada), a 505 nm,
166 sendo os resultados finais expressos em mg de glicogênio/g de tecido.

167 O homogeneizado para as análises das reservas de gorduras foi preparado seguindo o
168 descrito por Folch et al. (1957), sendo a extração com equipamento tipo Turrax[®] e
169 clorofórmio:metanol (2:1), em volume de 40 vezes o peso do tecido, seguida da filtração da
170 suspensão amostral. Dois processos de lavagem foram feitos, a fim de remover a mistura de
171 clorofórmio:metanol, acrescentando-se 2 mL de NaCl 0,9% (resfriado) para cada 10 mL de
172 homogeneizado, centrifugando a suspensão a 2.000 rpm por 10 minutos e descartando a fase
173 superior.

174 A determinação de lipídeos totais (LT), seguiu o método da sulfofosfovanilina de Frings &
175 Dunn (1970). Mantendo-se 20 µL das amostras teciduais em tubos de vidro com tampa, adicionou-se
176 1 mL de ácido sulfúrico e aqueceu-se estas suspensões a 100°C por 10 minutos. Passado este

177 tempo, os tubos foram resfriados em banho de gelo e adicionou-se 2,5 mL de Vanilina em cada
178 recipiente, para coloração do produto apolar. As leituras de absorvância foram realizadas em
179 triplicata, em espectrofotômetro a 530 nm, tendo os resultados finais expressos em mg de lipídeos/g
180 de tecido.

181 Utilizou-se o kit comercial para triglicerídeos da Labtest[®] (que segue a metodologia
182 colorimétrica enzimática) para mensurar os triacilgliceróis presentes nos tecidos amostrados.
183 Também foram feitas leituras por espectrofotometria, em triplicata, a 505 nm, estando os valores
184 expressos em mg de triacilgliceróis/g de tecido.

185

186 *Análises estatísticas*

187 Primeiramente, aplicou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificação da normalidade;
188 para os resultados que seguiram a hipótese alternativa (com valor de p igual ou inferior a 0,05), fez-se
189 uso do teste de Kruskal-Wallis, complementado pelo teste Student-Newman-Keuls. Nos resultados
190 que apresentaram valor de p superior a 0,05, adotou-se o teste de ANOVA de uma via, seguido do
191 teste de Levene para verificar a homogeneidade e definir o teste complementar (teste da Diferença
192 Mínima Significativa quando obteve-se variâncias iguais; e teste de Games-Howell para variâncias
193 iguais não-presumidas). Todos cálculos estatísticos foram realizados nos programas IBM SPSS
194 Statistics 20.0 e BioEstat 5.0, e assumiu-se como valor de significância p igual ou menor que 5%,
195 para indicar a existência de relação entre as variáveis testadas (Zar, 2010).

196

197 **Resultados**

198 O Roundup[®] provocou uma redução nas proteínas totais e nos lipídeos totais do tecido
199 branquial frente à concentração mais baixa (Fig. 13-A e C); e um aumento nas reservas de glicogênio
200 do mesmo tecido, porém na concentração mais alta (Fig. 13-B). No tecido hepático observamos um
201 acúmulo de glicogênio frente à ambas concentrações testadas (Fig. 14-B), e alterações nas reservas
202 de gordura quando expostos à 72 $\mu\text{g/L}$ com acúmulo de lipídeos totais e redução de triacilgliceróis
203 (Fig. 14-C e D). Os rins acumularam proteínas totais frente à 18 $\mu\text{g/L}$ e lipídeos totais frente à 72 $\mu\text{g/L}$
204 (Fig. 15-A e C). No tecido muscular, apenas as reservas de glicogênio mostraram-se alteradas, com
205 elevação nas duas concentrações testadas para este agroquímico (Fig. 16-B).

206 O herbicida Primoleo[®] também alterou o metabolismo dos indivíduos expostos, que
207 apresentaram depleção de proteínas totais branquiais frente às duas concentrações aplicadas, um
208 acúmulo de lipídeos totais e consumo de triacilgliceróis ainda no tecido branquial (Fig. 13-A, C e D). O
209 tecido hepático apresentou comportamento idêntico ao observado frente ao Roundup[®], com elevação
210 da reserva de glicogênio em ambas concentrações testadas, aumento de lipídeos totais na
211 concentração mais baixa e consumo de triacilgliceróis nas duas concentrações (Fig. 14-B, C e D). O
212 tecido renal apenas modificou seu estoque proteico, com elevação na primeira concentração (Fig. 15-
213 A). Já o tecido muscular apresentou alterações em todos os metabólitos testados, nas duas
214 concentrações utilizadas deste agroquímico (Fig. 16). Houve aumento das proteínas totais em ambas
215 concentrações, aumento na síntese do glicogênio frente a concentração mais elevada e, quando
216 expostos à 10 µg/L, os peixes estocaram lipídeos totais e consumiram suas reservas de
217 triacilgliceróis.

218 Frente ao agroquímico Facet[®], as brânquias diminuíram a concentração de proteínas totais e
219 de triacilgliceróis em ambas concentrações, e ainda de lipídeos totais quando os peixes foram
220 expostos à concentração mais baixa (Fig. 13-A, C e D). No fígado foi estocado glicogênio e
221 consumidos os triacilgliceróis, nas duas concentrações (Fig. 14-B e D). O tecido renal apenas
222 aumentou a síntese de glicogênio frente à 14 µg/L de Facet[®] (Fig. 15-B). Já a musculatura dos peixes
223 expostos aumentou a concentração de proteínas totais, diminuiu suas reservas de glicogênio e de
224 triacilgliceróis (Fig. 16-A, B e D), para as duas concentrações de Facet[®] utilizadas neste trabalho.

225

226 **Discussão**

227 Neste estudo, nenhuma das concentrações utilizadas acarretou na morte dos indivíduos
228 expostos, sendo assim consideradas subletais. Entretanto, em todas as situações de exposição
229 (considerando as concentrações e os herbicidas testados) houve algum tipo de alteração na
230 regulação do metabolismo dos indivíduos expostos. Tal fato nos permite afirmar que, mesmo em
231 concentrações extremamente baixas, a espécie *Rhamdia quelen* sofre com a exposição aos
232 agroquímicos Roundup[®], Primoleo[®] e Facet[®].

233 Fanta et al. (2003) também defendem a regularização e o controle do uso de agroquímicos,
234 mesmo que em baixas concentrações, após concluírem que o uso indiscriminado de xenobióticos

235 pode acarretar em alterações morfológicas e/ou bioquímicas mesmo em organismos não-alvo
236 expostos ao tóxico, como os peixes.

237 Por realizar trocas com o ambiente, as brânquias são de extrema importância para a
238 homeostase destes animais. Considerando que os herbicidas estão dissolvidos na água, estes
239 químicos ingressam no corpo do animal através do epitélio branquial. Neste tecido observamos uma
240 depleção das reservas de proteínas totais em todos os indivíduos expostos, exceto na concentração
241 mais alta do Roundup[®]. O catabolismo das proteínas pode indicar uma estratégia do peixe para
242 compensar a situação de estresse e garantir a funcionalidade tecidual. Autores como Fernández-
243 Vega et al. (2002) e Sancho et al. (2000) afirmam que pode-se observar uma hipoproteinemia tecidual
244 em peixes expostos a agrotóxicos. O Roundup[®] é conhecido como um agente estressor para peixes,
245 como a maioria dos poluentes aquáticos (Cericato et al., 2008; Menezes, 2010). Concordando com
246 esta proposição, o agroquímico ainda induziu a diminuição dos lipídios totais no tecido branquial, na
247 mesma concentração em que foi observada a depleção proteica, sugerindo uma alta demanda
248 energética para a manutenção funcional.

249 Quando os indivíduos foram expostos à concentração mais elevada do Roundup[®] (72 µg/L)
250 detectou-se um incremento de glicogênio, porém sem alteração nas reservas de gordura nesta
251 situação experimental. Cabe destacar também que foi a única situação onde observou-se alteração
252 neste metabólito no tecido branquial, quando comparadas as respostas frente aos três herbicidas
253 testados. Podemos assim sugerir que, nesta situação, o acúmulo desta reserva esteja visando a
254 manutenção do balanço energético, e assim, a funcionalidade tecidual.

255 Frente aos herbicidas Primoleo[®] e Facet[®], os animais utilizaram as reservas branquiais de
256 triacilgliceróis na concentração mais baixa do Primoleo[®] e em ambas do Facet[®], sendo esta
257 acompanhada de uma redução dos lipídeos totais naqueles animais expostos à concentração mais
258 baixa do Facet[®]. Paralelamente à depleção de triacilgliceróis, observamos uma diminuição das
259 proteínas totais em ambas as concentrações testadas para o Primoleo[®]. Um incremento dos lipídeos
260 totais frente à concentração mais baixa deste agroquímico pode revelar o incremento de um outro
261 componente lipídico que não os triacilgliceróis, possivelmente colesterol e fosfolipídeos que poderiam
262 ser utilizados na membrana plasmática como um mecanismo de defesa contra a lipoperoxidação. É
263 sabido que o colesterol é o precursor de hormônios esteroidais, dos ácidos biliares, além de um
264 importante componente estrutural da membrana plasmática; em células de mamíferos têm sido

265 mostrado que o colesterol regula bombas iônicas como a $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ e a $\text{Ca}^{+2}\text{ATPase}$, modulando
266 também a atividade de outras proteínas de membrana junto com os fosfolípidos (Yeagle, 1989).
267 Senhorin et al. (2014) encontraram os níveis de colesterol plasmático reduzidos, quando analisaram
268 indivíduos de bagre-surumim expostos à 2,25 e 15 mg/L de Roundup[®], o que reforça esta hipótese.

269 Autores já publicaram aumento de lipoperoxidação no tecido brânquial de diferentes espécies
270 de peixes expostos a xenobióticos, como Paulino et al. (2012) para brânquias de *Prochilodus lineatus*
271 expostos à atrazina (princípio ativo do Primoleo[®]); Kochhann et al. (2009) para brânquias de *Rhamdia*
272 *quelen* expostos ao elemento Tório; Nunes et al. (2014) para brânquias de *Gambusia holbrooki*
273 expostos aos elementos Cobre e Cádmio. Tal conjunto de resultados confirmam que os xenobióticos
274 prejudicam a integridade deste importante órgão, nos permitindo sugerir que a diminuição dos
275 triacilgliceróis e do conteúdo proteico estejam sendo mobilizadas na tentativa de estabilizar a
276 homeostase energética, aliado a uma maior quantidade de lipídeos totais (possivelmente colesterol
277 e/ou fosfolípidos utilizados na composição da membrana plasmática) e assim garantindo a
278 sobrevivência dos animais. Cabe ressaltar que as brânquias representam uma interface direta do
279 animal com o meio ambiente, sendo estas responsáveis pela osmorregulação, excreção de
280 compostos nitrogenados e hematose. Sugere-se que mais estudos sejam realizados buscando
281 comparar os resultados aqui obtidos para as modificações metabólicas no tecido branquial, em
282 especial nos níveis de glicogênio, colesterol e fosfolípidos.

283 Nos vertebrados, o fígado está envolvido na síntese de substâncias nitrogenadas, ocupando
284 papel central no metabolismo de carboidratos e de lipídeos, e na detoxificação do organismo, entre
285 outras funções (Lehninger et al., 2002). Uma diminuição dos triacilgliceróis e um aumento do
286 glicogênio tecidual foram observados neste tecido nos animais expostos às duas concentrações de
287 Primoleo[®] e Facet[®], bem como na concentração mais alta de Roundup[®]. Sabe-se que a degradação
288 de triacilgliceróis gera ácidos graxos, que podem ser utilizados para a síntese de corpos cetônicos,
289 substrato alternativo ao uso da glicose; como também glicerol, que pode ser utilizado para a síntese
290 de glicose, possibilitando assim além da manutenção da glicemia destes animais, a síntese de
291 glicogênio. Tais respostas podem estar sendo determinadas pela liberação de hormônios contra
292 regulatórios como o glucagon, a adrenalina e/ou o cortisol. Desta forma, estes indivíduos estariam
293 utilizando os triacilgliceróis como fonte de energia para a manutenção da homeostase, como também
294 incrementando o estoque de glicogênio hepático.

295 Este perfil de resposta é reforçado pelos resultados obtidos por Gluszczak et al. (2006), que
296 mostram aumento da glicose e do glicogênio no tecido hepático de piavas expostas por 96 horas ao
297 glifosato, em concentrações entre 3 e 20 mg/L. Gluszczak et al. (2007) realizaram seu estudo com a
298 mesma espécie aqui em discussão, encontrando também um incremento nos níveis de glicogênio
299 hepático após a exposição dos peixes à 0,2 e 0,4 mg/L de Roundup®.

300 Constatou-se, ainda no fígado, um estímulo à produção de lipídeos totais na concentração
301 superior de Roundup® e na inferior do Primoleo®, sendo possivelmente um incremento nos níveis de
302 colesterol e/ou fosfolipídeos, visto que houve o consumo das reservas de triacilgliceróis em ambas as
303 situações experimentais. Estes resultados discordam de Sancho et al. (1998), que observaram um
304 decréscimo dos lipídeos totais no tecido hepático da enguia europeia *Anguilla anguilla* exposta ao
305 organofosforado Fenitrothion. Contudo, Mela et al. (2013) visualizaram alterações importantes no
306 tecido hepático de indivíduos de *Rhamdia quelen* expostos por 96 horas às concentrações de 2, 10, e
307 100 µg/L de atrazina como a infiltração de leucócitos, vacuolização de hepatócitos como esteatose e
308 a ocorrência de áreas de necrose. Os autores defendem que esta vacuolização é frequente no fígado
309 de teleósteos expostos a contaminantes tóxicos, incluindo a atrazina, e que distúrbios no
310 metabolismo lipídico ou na estrutura do citoesqueleto podem acarretar no aumento da vacuolização
311 citoplasmática no fígado de peixes (Mela et al., 2007). Sabendo que a esteatose se caracteriza pela
312 infiltração intracitoplasmática de grandes gotículas de gorduras (lipídeos) devido a alterações no
313 metabolismo lipoproteico (Law & Brunt, 2010), neste caso no tecido hepático, poderíamos encontrar
314 um aumento significativo dos níveis de lipídeos totais se analisados estes órgãos bioquimicamente.
315 Assim, propomos que a vacuolização dos hepatócitos pode ser um mecanismo de defesa de
316 *Rhamdia quelen*, uma vez que estas gotículas lipídicas podem sequestrar pesticidas solúveis em
317 gorduras e assim minimizar seu efeito tóxico neste tecido, concordando com os resultados
318 bioquímicos encontrados neste estudo.

319 Podemos sugerir que o glucagon, hormônio contrarregulador da insulina, estaria promovendo
320 a lipólise nos animais testados com o herbicida Facet®, aumentando os níveis plasmáticos de ácidos
321 graxos e glicerol (Zanuto et al., 2011). Não realizamos análises no plasma, porém os resultados
322 encontrados neste tecido concordam com o proposto pelos autores, visto que houve depleção dos
323 triacilgliceróis nas brânquias, fígado e músculo destes peixes. Zanuto et al. (2011) ainda afirmam que

324 o glucagon atua diretamente nos adipócitos de maneira sinérgica à adrenalina com a promoção de
325 lipólise.

326 O tecido renal não apresentou alteração nas reservas de triacilgliceróis em nenhuma
327 condição experimental. Houve síntese proteica no tecido renal, nas concentrações mais baixas de
328 Roundup® e Primoleo®, podendo ser uma tentativa de reparo aos danos celulares provocados pelo
329 xenobiótico. Os rins dos indivíduos expostos à concentração mais alta de Roundup® e Facet®
330 apresentaram também um aumento no estoque de lipídeos totais e glicogênio, respectivamente.
331 Estes possivelmente relacionam-se com a manutenção da homeostase dos indivíduos, buscando
332 armazenar reservas para a sustentação da funcionalidade tecidual.

333 O músculo é formado, principalmente, por proteínas e é o órgão responsável pelo
334 fornecimento da força contrátil para o movimento (Moyes & Schulte, 2010), além do armazenamento
335 de glicose e gorduras como fontes de energia estocada. Sahib et al. (1984) observaram um aumento
336 na síntese de proteínas totais nos tecidos muscular e hepático de tilápias, expostas ao herbicida 2,4-
337 Diamin. Mais tarde, Fonseca et al. (2008) também encontraram níveis proteicos elevados, em tecido
338 muscular de piavas expostas ao mesmo herbicida. Estes justificam o aumento da síntese como
339 compensatório pelas perdas proteicas, devido ao estresse causado pelo tóxico. Padrão de resposta
340 semelhante foi observado no tecido muscular dos jundiás, quando expostos a ambas as
341 concentrações do Primoleo® e do Facet®. Toni et al. (2013) explicam que a proteína é um dos
342 principais alvos para a elucidação dos efeitos de pesticidas em várias espécies de peixes, pois eles
343 induzem a modificação oxidativa destas moléculas, como forma de suprir a elevada demanda
344 energética da qual o corpo está necessitando na situação do estresse (Sahib et al., 1984).

345 Quando em contato com ambas as concentrações testadas para o Roundup®, os peixes
346 acumularam glicogênio no tecido muscular, fato ocorrido também com a concentração mais alta de
347 Primoleo®. Na concentração inferior deste último agroquímico, ainda observamos um aumento dos
348 lipídeos totais aliados à diminuição dos triacilgliceróis. Novamente, os triacilgliceróis parecem ser um
349 substrato importante para a síntese de ATP e para a manutenção da homeostase energética e
350 tecidual. Hill et al. (2012) afirmam que, no músculo, o ATP é produzido por três mecanismos
351 principais: pela transferência do fosfato de alta energia da creatina para o ADP; pela glicólise e pela
352 fosforilação oxidativa.

353 O aumento do glicogênio aqui constatado discorda do sugerido por outros autores (Fonseca
354 et al., 2008; Oruç & Üner, 1999; Sancho et al., 1998), e constatado por Gluszczak et al. (2006) que
355 observaram um decréscimo nos níveis de glicogênio e glicose, e ainda um aumento nas proteínas
356 totais e no lactato no tecido muscular de piavas, após a exposição à concentrações de glifosato (3 a
357 20 mg/L). Contudo, devemos destacar há uma responsividade seletiva aos agroquímicos (Ahmad et
358 al., 2000), sendo esta dependente não apenas da espécie em estudo, mas também dos seus hábitos
359 de vida, da especialização alimentar e da dieta à qual os animais foram submetidos.

360

361 **Conclusões**

362 Todos os tecidos estudados mostram alterações do seu perfil metabólico quanto aos níveis
363 de proteínas totais, lipídeos totais, triacilgliceróis e glicogênio, evidenciando uma responsividade
364 própria a cada um. Contudo, as brânquias e o fígado foram os tecidos mais fortemente afetados pela
365 exposição aos herbicidas estudados. Considerando o papel funcional destes dois tecidos, aliado aos
366 efeitos causados principalmente pelo herbicida Facet[®] no tecido branquial, sugere-se que este
367 agroquímico tenha uma regulamentação própria ao seu uso nas águas superficiais de nosso país;
368 também, cabe revisar as concentrações permitidas para o uso de glifosato (Roundup[®]) visto que,
369 mesmo em concentração inferior à permitida por lei, este provocou alterações no metabolismo dos
370 indivíduos. Sugere-se ainda que mais estudos sejam desenvolvidos envolvendo o armazenamento
371 das reservas lipídicas nos tecidos de peixes expostos à agroquímicos.

372

373 **Agradecimentos**

374 À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de
375 Pesquisa (CNPq) pelas bolsas de apoio concedidas.

376

377 **Conflitos de interesse**

378 Não há.

379 **Referências**

- 380 Ahmad, I., Hamid, T., Fatima, M., Chand, H. S., Jain, S. K., Athar, M., & Raisuddin, S. (2000). Induction of hepatic antioxidants
381 in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Biochimica et Biophysica*
382 *Acta*, 1523, 37–48.
- 383 Albinati, a. C. L., Moreira, E. L. T., Albinati, R. C. B., Carvalho, J. V., De Lira, a. D., Santos, G. B., & Vidal, L. V. O. (2009).
384 Biomarcadores histológicos - toxicidade crônica pelo Roundup em piauçu (*Leporinus macrocephalus*). *Arquivo Brasileiro de*
385 *Medicina Veterinária E Zootecnia*, 61(3), 621–627.

- 386 Amarante Junior, O. P. de, Santos, T. C. R. dos, Brito, N. M., & Ribeiro, M. L. (2002). Glifosato: Propriedades, Toxicidade, Usos
387 E Legislação. *Química Nova*, 25(4), 589–593.
- 388 Baldisserotto, B., & Neto, J. R. (2004). *Criação de Jundiá* (p. 232). Santa Maria: Ed. UFSM.
- 389 Barcellos, G., Kreutz, L. C., Rodrigues, L. B., Fioreze, I., Quevedo, R. M., Cericato, L., ... Terra, S. (2003). Haematological and
390 biochemical characteristics of *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard Pimelodidae): changes after acute stress. *Aquaculture*
391 *Research*, 34, 1465–1469.
- 392 Bidinotto, P. M., Souza, R. H. S., & Moraes, G. (1997). Hepatic glycogen in eight tropical fresh water teleost fish: A procedure
393 for field determinations of micro samples. *Bol. Téc. CEPTA, Pirassununga*, 10, 53–60.
- 394 Bortoluzzi, E. C., Rheinheimer, D. D. S., Gonçalves, C. S., Pellegrini, J. B. R., Zanella, R., & Copetti, A. C. C. (2006).
395 Contaminação de águas superficiais por agrotóxicos em função do uso do solo numa microbacia hidrográfica de Agudo,
396 RS. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola E Ambiental*, 10(4), 881–887.
- 397 Carneiro, P. C. F., & Mikos, J. D. (2005). Freqüência alimentar e crescimento de alevinos de jundiá,. *Ciência Rural*, 35(1), 187–
398 191.
- 399 Cericato, L., Machado, J. G., Fagundes, M., Kreutz, L. C., Quevedo, R. M., Finco, J., ... Barcellos, L. J. G. (2008). Cortisol
400 response to acute stress in jundia *Rhamdia quelen* acutely exposed to sub-lethal concentrations of agrichemicals.
401 *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology*, 148(3), 281–286. doi:10.1016/j.cbpc.2008.06.008
- 402 Deschamps, F. C., Marschalek, R., & Kleveston, R. (2013). Agrotóxicos Na Água Superficial Sugerem Melhorias. In *VIII*
403 *Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado*. Santa Maria.
- 404 Fanta, E., Rios, F. S., Romão, S., Vianna, a. C. C., & Freiburger, S. (2003). Histopathology of the fish *Corydoras paleatus*
405 contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54(2),
406 119–130.
- 407 Fernández-Vega, C., Sancho, E., Ferrando, M. D., & Andreu, E. (2002). Thiobencarb-Induced Changes in Acetylcholinesterase
408 Activity of the Fish *Anguilla anguilla*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 72(1), 55–63. doi:10.1006/pest.2001.2581
- 409 Folch, J., Lees, M., & Stanley, G. H. S. (1957). A Simple Method For The Isolation And Purification Of Total Lipides From
410 Animal Tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226, 497–509.
- 411 Fonseca, M. B. da, Glusczak, L., Moraes, B. S., de Menezes, C. C., Pretto, A., Tierno, M. A., ... Loro, V. L. (2008). The 2,4-D
412 herbicide effects on acetylcholinesterase activity and metabolic parameters of piava freshwater fish (*Leporinus obtusidens*).
413 *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 69(3), 416–20. doi:10.1016/j.ecoenv.2007.08.006
- 414 Frings, C., & Dunn, R. (1970). A colorimetric method for determination of total serum lipids based on the sulfophosphovanillin
415 reaction. *American Journal of Clinical Pathology*, 53, 89–91.
- 416 Glusczak, L., dos Santos Miron, D., Crestani, M., Braga da Fonseca, M., de Araújo Pedron, F., Duarte, M. F., & Vieira, V. L. P.
417 (2006). Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava
418 (*Leporinus obtusidens*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 65(2), 237–241. doi:10.1016/j.ecoenv.2005.07.017
- 419 Glusczak, L., Miron, D. D. S., Moraes, B. S., Simões, R. R., Schetinger, M. R. C., Morsch, V. M., & Loro, V. L. (2007). Acute
420 effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Comparative*
421 *Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology : CBP*, 146(4), 519–24. doi:10.1016/j.cbpc.2007.06.004
- 422 Gomes, L. de C., Golombieski, J. I., Gomes, A. R. C., & Baldisserotto, B. (2000). Biologia Do Jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei,
423 Pimelodidae), 179–185.
- 424 Griboff, J., Morales, D., Bertrand, L., Bonansea, R. I., Monferrán, M. V., Asis, R., ... Amé, M. V. (2014). Oxidative stress
425 response induced by atrazine in *Palaemonetes argentinus*: The protective effect of vitamin E. *Ecotoxicology and*
426 *Environmental Safety*, 108, 1–8. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.06.025
- 427 Hill, R. W., Wyse, G. A., & Anderson, M. (2012). *Fisiologia animal* (p. 894). Porto Alegre: Artmed.
- 428 Kochhann, D., Pavanato, M. a, Llesuy, S. F., Correa, L. M., Konzen Riffel, A. P., Loro, V. L., ... Baldisserotto, B. (2009).
429 Bioaccumulation and oxidative stress parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to different thorium
430 concentrations. *Chemosphere*, 77(3), 384–91. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.07.022
- 431 Law, K., & Brunt, E. M. (2010). Nonalcoholic fatty liver disease. *Clinics in Liver Disease*, 14(4), 591–604.
432 doi:10.1016/j.cld.2010.07.006
- 433 Lehninger, A. L., Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2002). *Princípios de Bioquímica* (3ªed ed., p. 975 p.). São Paulo: Sarvier.

- 434 Marchesan, E., Zanella, R., Avila, L. A. De, Camargo, E. R., Machado, S. L. de O., & Macedo, V. R. M. (2007). Rice Herbicide
435 Monitoring In Two Brazilian Rivers During The Rice Growing Season. *Sci. Agric.*, 64(2), 131–137.
- 436 Mela, M., Guiloski, I. C., Doria, H. B., Randi, M. a F., de Oliveira Ribeiro, C. a, Pereira, L., ... Silva de Assis, H. C. (2013).
437 Effects of the herbicide atrazine in neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 93, 13–
438 21. doi:10.1016/j.ecoenv.2013.03.026
- 439 Mela, M., Randi, M. a F., Ventura, D. F., Carvalho, C. E. V., Pelletier, E., & Oliveira Ribeiro, C. a. (2007). Effects of dietary
440 methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. *Ecotoxicology and Environmental*
441 *Safety*, 68(3), 426–35. doi:10.1016/j.ecoenv.2006.11.013
- 442 Menezes, C. C. De. (2010). *Parâmetros De Estresse Oxidativo Em Jundiás (*Rhamdia quelen*) Expostos A Formulações*
443 *Comerciais Dos Herbicidas Glifosato E Clomazone*. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA.
- 444 Moyes, C. D., & Schulte, P. M. (2010). *Princípios de Fisiologia Animal* (p. 792 p.). Porto Alegre: Artmed.
- 445 Nunes, B., Caldeira, C., Pereira, J. L., Gonçalves, F., & Correia, A. T. (2014). Perturbations in ROS-related processes of the fish
446 *Gambusia holbrooki* after acute and chronic exposures to the metals copper and cadmium. *Environmental Science and*
447 *Pollution Research*. doi:10.1007/s11356-014-3580-6
- 448 Oruç, E. Ö., & Üner, N. (1999). Effects of 2,4-Diamin on some parameters of protein and carbohydrate metabolisms in the
449 serum , muscle and liver of *Cyprinus carpio*. *Environmental Pollution*, 105, 267–272.
- 450 Paulino, M. G., Souza, N. E. S., & Fernandes, M. N. (2012). Subchronic exposure to atrazine induces biochemical and
451 histopathological changes in the gills of a Neotropical freshwater fish, *Prochilodus lineatus*. *Ecotoxicology and*
452 *Environmental Safety*, 80(1), 6–13. doi:10.1016/j.ecoenv.2012.02.001
- 453 Queiroz, G. M. P., Silva, M. R. da, Bianco, R. J. F., Pinheiro, A., & Kaufmann, V. (2011). Transporte De Glifosato Pelo
454 Escoamento Superficial E Por Lixiviação Em Um Solo Agrícola. *Química Nova*, 34(2), 190–195.
- 455 Reis, R. E., Kullanser, S. O., & Ferraris Jr., C. J. (2003). *Check list of the freshwater fisher of south and Central America*. Porto
456 Alegre: EDIPUCRS.
- 457 Sahib, I. K. A., Rao, K. R. S. S., & Rao, K. V. R. (1984). Effect of malathion on protein synthetic potentiality of the tissues of the
458 teleost, *Tilapia mostambica* (Peters), as measured through incorporation of (14C) amino acids. *Toxicology Letters*, 20(1),
459 63–67.
- 460 Samanta, P., Pal, S., Mukherjee, A. K., & Ghosh, A. R. (2014). Biochemical effects of glyphosate based herbicide, Excel Mera
461 71 on enzyme activities of acetylcholinesterase (AChE), lipid peroxidation (LPO), catalase (CAT), glutathione-S-transferase
462 (GST) and protein content on teleostean fishes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 107, 120–5.
463 doi:10.1016/j.ecoenv.2014.05.025
- 464 Sancho, E., Cerón, J. J., & Ferrando, M. D. (2000). Cholinesterase activity and hematological parameters as biomarkers of
465 sublethal molinate exposure in *Anguilla anguilla*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 46(1), 81–6.
466 doi:10.1006/eesa.1999.1888
- 467 Sancho, E., Ferrando, M. D., Fernández, C., & Andreu, E. (1998). Liver energy metabolism of *Anguilla anguilla* after exposure to
468 fenitrothion. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 41(2), 168–75. doi:10.1006/eesa.1998.1689
- 469 Santos, T. G., & Martinez, C. B. R. (2012). Atrazine promotes biochemical changes and DNA damage in a Neotropical fish
470 species. *Chemosphere*, 89(9), 1118–25. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.05.096
- 471 Sinhorin, V. D. G., Sinhorin, A. P., Teixeira, J. M. S., Miléski, K. M. L., Hansen, P. C., Moeller, P. R., ... Loro, V. L. (2014).
472 Metabolic and behavior changes in surubim acutely exposed to a glyphosate-based herbicide. *Archives of Environmental*
473 *Contamination and Toxicology*, 67(4), 659–67. doi:10.1007/s00244-014-0073-z
- 474 Toni, C., Menezes, C., Clasen, B., Leitemperger, J., Pretto, A., Adaime, M. B., ... Lucia Loro, V. (2013). Oxidative stress in carp
475 exposed to quinclorac herbicide under rice field condition. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 92, 27–31.
476 doi:10.1016/j.ecoenv.2013.01.028
- 477 Van Handel, E. (1965). Estimation of glycogen in small amounts of tissue. *Analytical Biochemistry*, 11(2), 256–65. Retrieved
478 from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5840660>
- 479 Yeagle, P. L. (1989). Lipid regulation of cell membrane structure and function. *The FASEB Journal*, 3, 1833–1842.
- 480 Zanuto, R., Lorenzetti, F. M., Lima, W. P., & Carnevali Jr., L. C. (2011). *Biologia e Bioquímica: bases aplicadas às ciências da*
481 *saúde* (p. 304). São Paulo: Phorte.
- 482 Zar, J. H. (2010). *Biostatistical Analysis* (5ª ed., p. 960 p.). Upper Saddle River: Pearson Prentice-Hall.

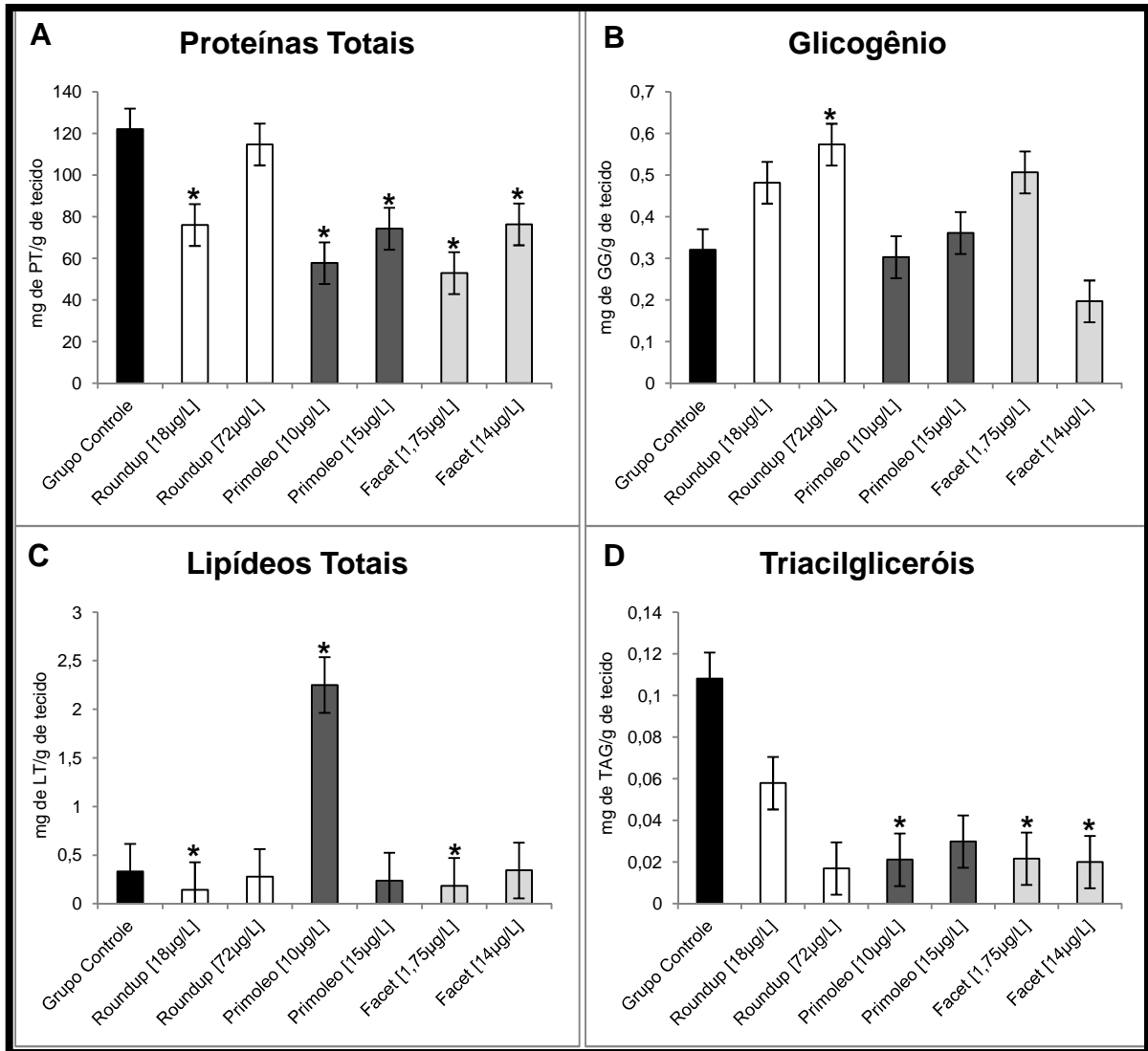


Figura 13. Resultados do metabolismo no tecido branquial: proteínas totais (A), glicogênio (B), lipídeos totais (C) e triacilgliceróis (D) dos alevinões de *Rhamdia quelen*, expressos em média \pm erro padrão. O símbolo (*) identifica as diferenças significativas em relação ao grupo controle, com valor de $p < 0,05$.

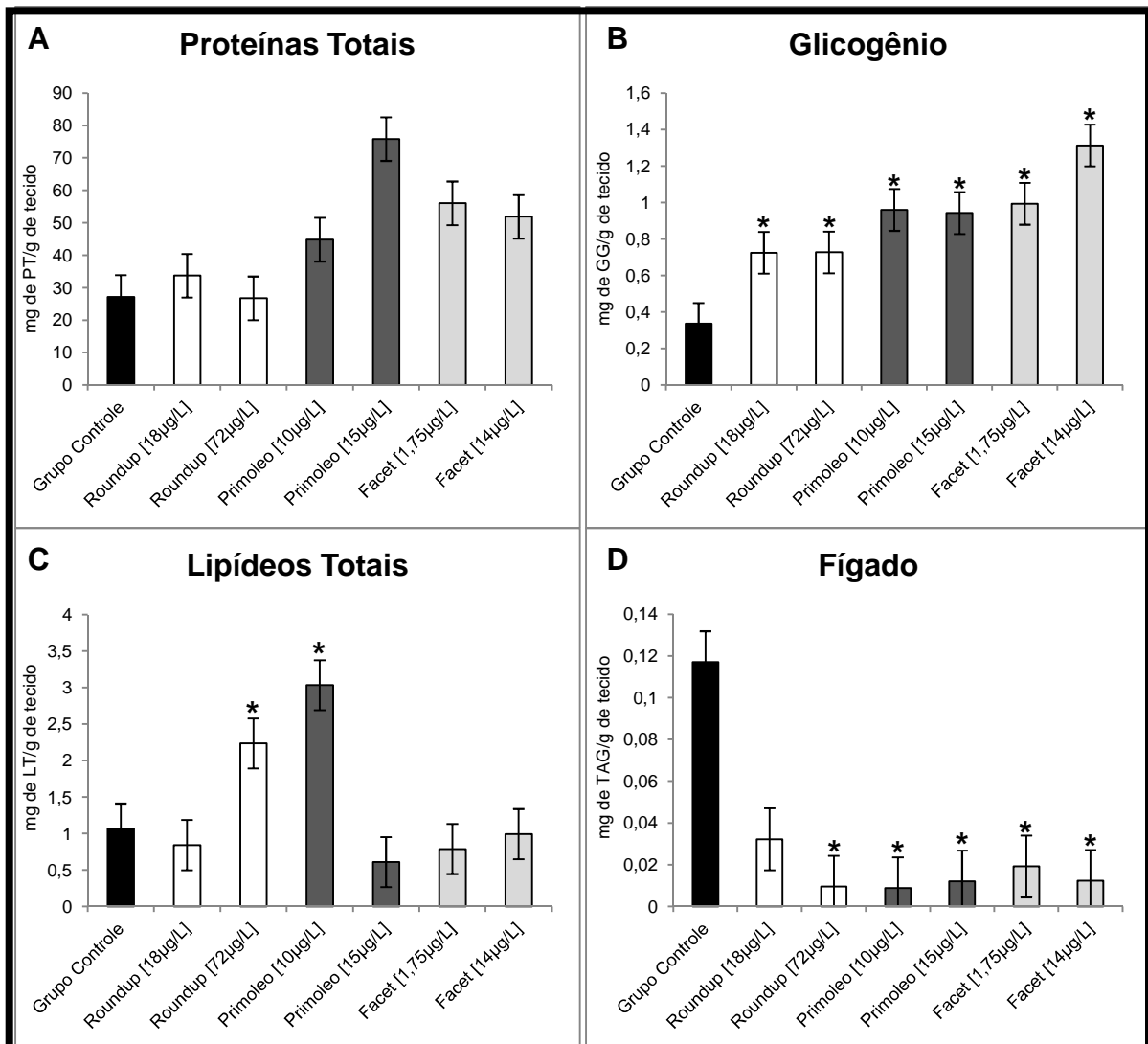


Figura 14. Resultados do metabolismo no tecido hepático: proteínas totais (A), glicôgênio (B), lipídeos totais (C) e triacilgliceróis (D) dos aleviões de *Rhamdia quelen*, expressos em média \pm erro padrão. O símbolo (*) identifica as diferenças significativas em relação ao grupo controle, com valor de $p < 0,05$.

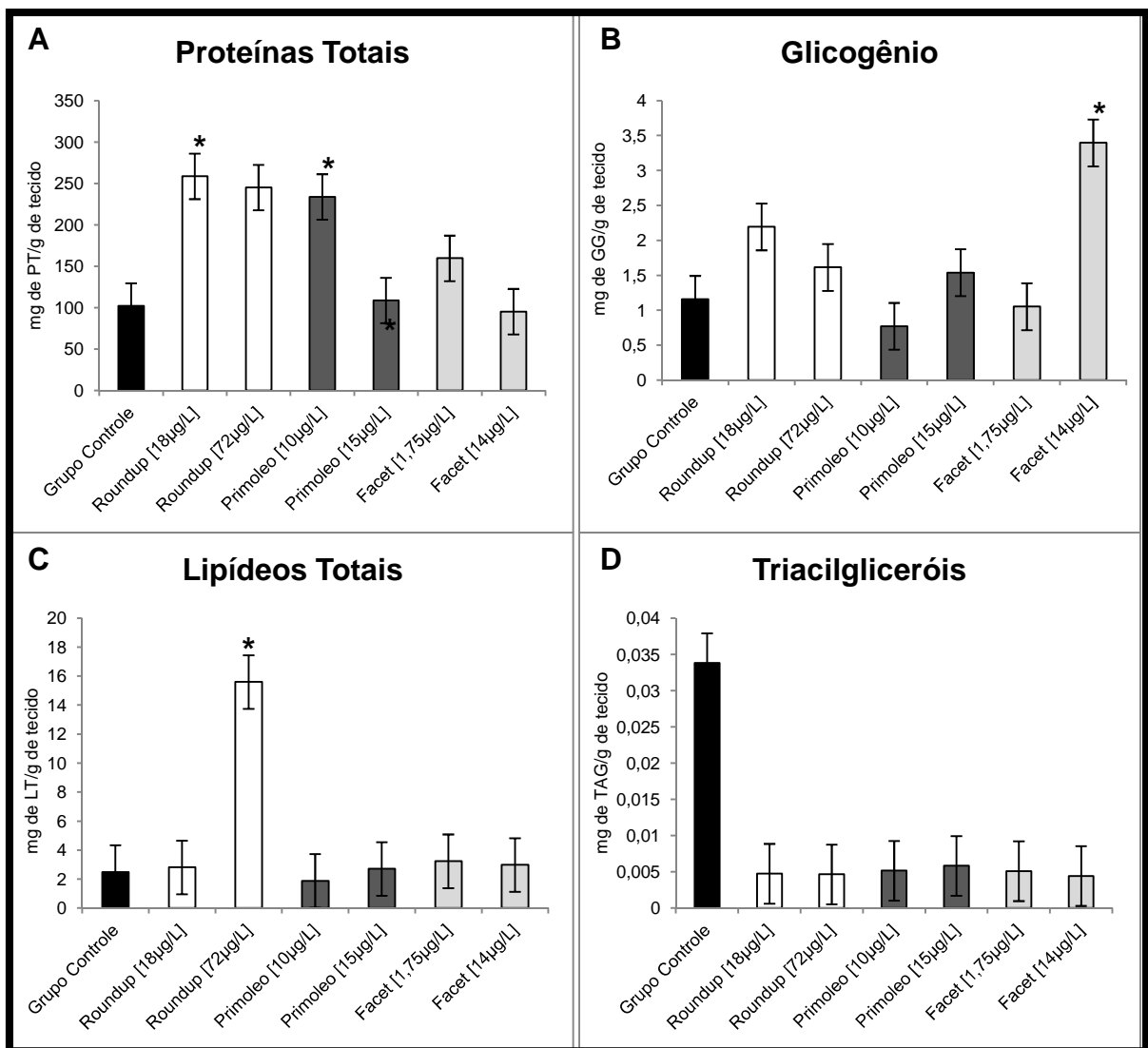


Figura 15. Resultados do metabolismo no tecido renal: proteínas totais (A), glicogênio (B), lipídeos totais (C) e triacilgliceróis (D) dos alevinões de *Rhamdia quelen*, expressos em média \pm erro padrão. O símbolo (*) identifica as diferenças significativas em relação ao grupo controle, com valor de $p < 0,05$.

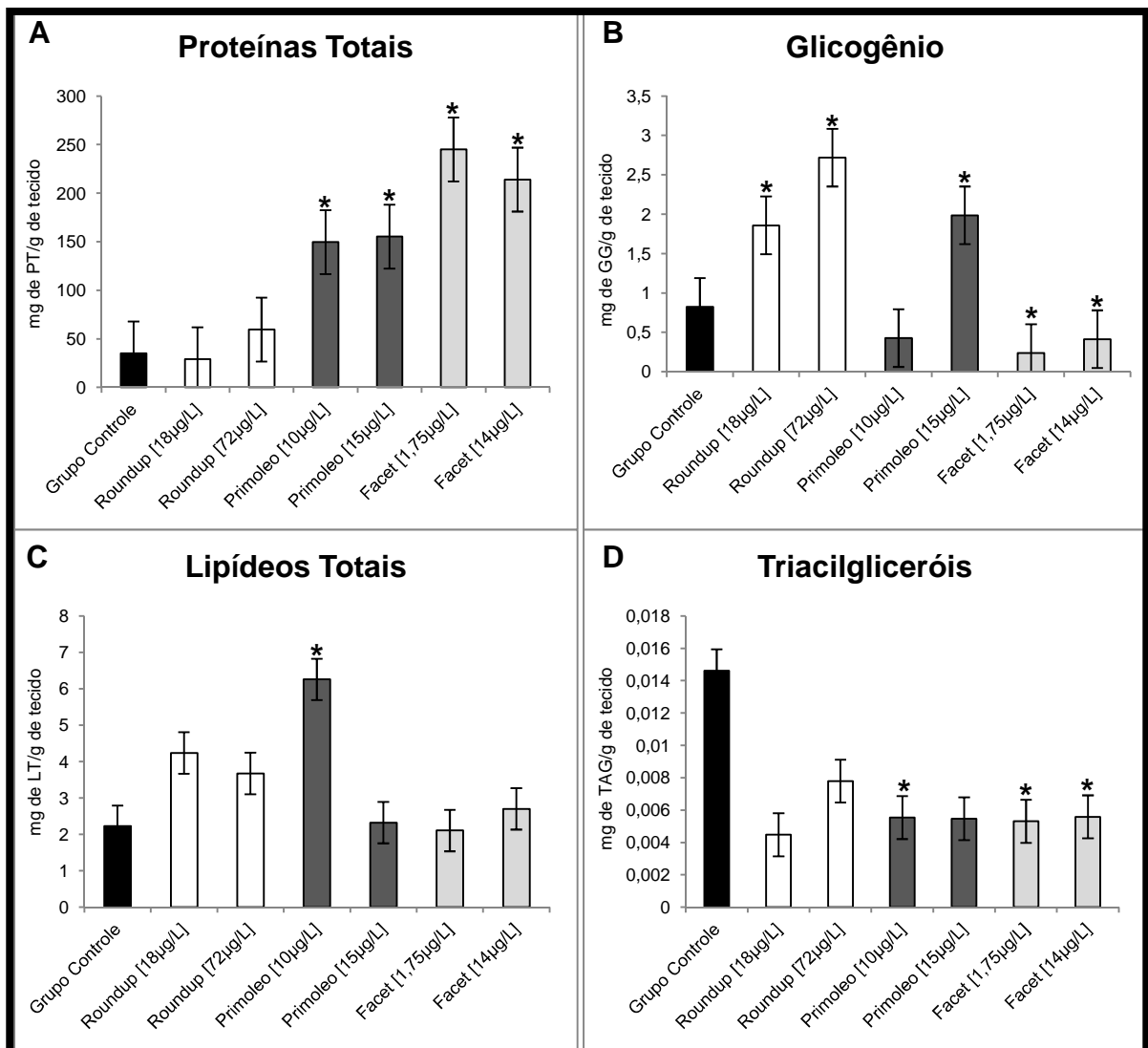


Figura 16. Resultados do metabolismo no tecido muscular: proteínas totais (A), glicôgênio (B), lipídeos totais (C) e triacilgliceróis (D) dos aleviões de *Rhamdia quelen*, expressos em média \pm erro padrão. O símbolo (*) identifica as diferenças significativas em relação ao grupo controle, com valor de $p < 0,05$.

CAPÍTULO 3

*Status oxidativo e lipoperoxidação de *Rhamdia quelen* determinados pela exposição aos agroquímicos Roundup[®], Primoleo[®] e Facet[®]*

1 **Status oxidativo e lipoperoxidação de *Rhamdia quelen* determinados pela exposição aos**
2 **agroquímicos Roundup[®], Primoleo[®] e Facet[®]**

3
4 Tanilene Sotero Pinto Persch^{1,2}, Patrícia Rodrigues da Silva¹, Sarah Helen Dias dos Santos¹,
5 Betânia Souza de Freitas¹, Guendalina Turcato Oliveira^{1,2,3*}

6
7 **Resumo**

8 A exposição aos agroquímicos afetam inclusive organismos não-alvo. Assim, indivíduos de jundiá
9 foram expostos por 7 dias aos herbicidas Roundup[®] (18 e 72 µg/L), Primoleo[®] (10 e 15 µg/L) e Facet[®]
10 (1,75 e 14 µg/L), buscando verificar possíveis alterações no balanço oxidativo destes, por meio da
11 análises das enzimas superóxido dismutase e catalase, bem como dos níveis de lipoperoxidação
12 (TBARS) nos tecidos branquial, hepático, renal e muscular. O Facet[®] foi o agroquímico que mais
13 causou alterações bioquímicas nos organismos testados, seguido do Primoleo[®] e do Roundup[®]. O
14 tecido renal mostrou-se um excelente indicador de poluição ambiental, com destaque à catalase
15 como principal enzima ativada no processo de detoxificação. Faz-se necessário ampliar o número de
16 estudos mimetizando as situações ambientais de exposição a agroquímicos em espécies não-alvo,
17 para propor uma revisão na legislação vigente no Brasil, a fim de que produtos com o princípio ativo
18 quinclorac tenham seu uso controlado.

19
20 **Palavras-chave**

21 peixes; jundiá; estresse oxidativo; glifosato; atrazina; quinclorac

22
23 **Introdução**

24 Os agrotóxicos são contaminantes aquáticos decorrentes de atividades antropogênicas, tendo
25 como principal objetivo a eliminação de alguma forma de vida, sendo letais ou causando
26 modificações fisiológicas e/ou morfológicas, inclusive em espécies não-alvo. O glifosato é utilizado na
27 agricultura em aplicações variáveis, conforme a necessidade frente a erva daninha. Oliveira Jr. et al.

¹ Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Laboratório de Fisiologia da Conservação

² Faculdade de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Zoologia

³ Bolsista de Produtividade do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq - 307303/2012-8)

*Autor Correspondente em: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Faculdade de Biociências, Laboratório de Fisiologia da Conservação; Av. Ipiranga, 6681 prédio 12-C; Porto Alegre/RS/Brazil; Tel. +55 51 3320.3545, fax: +55 51 3320.3568, e-mail guendato@pucls.br

28 (2013) listaram os 21 nomes comerciais dos herbicidas a base de glifosato mais utilizados e com
29 registro para o controle da buva, entre eles o Roundup[®], incluindo doses para aplicação e culturas
30 recomendadas. Contudo, em culturas de arroz irrigado, o agroquímico interage com inúmeras
31 espécies não-alvo habitantes do ecossistema aquático.

32 O fabricante do Roundup[®], a empresa Monsanto do Brasil Ltda., afirma na bula do produto
33 que a toxicidade aguda deste pesticida é considerada baixa indicando como Dose Letal (DL₅₀) oral do
34 glifosato puro em ratos de 5.600 mg/kg. Amarante Junior et al. (2002) explicam que a baixa toxicidade
35 em animais pode ser atribuída pela ação do glifosato em um caminho metabólico exclusivo das
36 plantas (mecanismo do ácido chiquímico), similar ao existente em alguns microorganismos mais
37 complexos, porém, sem equivalente em animais, podendo impedir a ação de funções enzimáticas nos
38 animais. Contudo, diversos autores já publicaram uma Concentração Letal (CL₅₀) deste agrotóxico
39 para espécies de peixes, sendo esta variável entre 2 e 55 mg/L, segundo Cavalcante et al. (2008),
40 dependendo da espécie testada e das condições do teste: Langiano & Martinez (2008) obtiveram a
41 CL₅₀ de 13,69 mg/L para *Prochilodus lineatus*, a uma formulação de Roundup[®] contendo 41% de
42 glifosato; Albinati et al. (2007) encontraram valores de CL₅₀ de 15,8 ppm para juvenis de piaçu
43 (*Leporinus macrocephalus*); Soso et al. (2007) trabalharam com jundiás (*Rhamdia quelen*) e
44 obtiveram a CL₅₀ de 3,6 mg/L ao herbicida Roundup[®] WG, que contém 64% de glifosato. Glusczak
45 (2008) lista alguns estudos comparativos entre o Roundup[®] e o princípio ativo glifosato, e revela que
46 o valor de CL₅₀ do Roundup[®] para truta arco-íris foi de 8,3 mg/L (2,6 mg e.a./L), enquanto que a CL₅₀
47 do glifosato, no mesmo estudo, foi de 140 mg e.a./L.

48 O Primoleo[®] é o herbicida mais utilizado nos Estados Unidos (Marchesan, 2011), sendo
49 fabricado no Brasil pela Syngenta Proteção de Cultivos Ltda, e seu princípio ativo é a atrazina,
50 podendo contaminar o solo, águas subterrâneas e/ou córregos, e facilmente pode ser detectado no
51 sistema de abastecimento público (Carmo et al., 2013). Este agrotóxico também foi desenvolvido com
52 ação específica em vegetais, apresentando similaridade à quinona B (QB), que bloqueia a atividade
53 desta molécula na proteína, interrompendo o fluxo de elétrons no fotossistema (Vidal, 1997). Porém,
54 este xenobiótico já foi testado por vários autores, que comprovaram seu efeito em espécies não-alvo
55 de diversos grupos taxonômicos, tendo Hayes et al. (2010, 2011) inferido que este agroquímico induz
56 à desmasculinização e feminilização das gônadas de machos de diferentes grupos taxonômicos
57 (peixes teleósteos, anfíbios, répteis e mamíferos).

58 O quinclorac é fabricado pela Basf S/A e vendido com o nome comercial Facet[®], sob forma de
59 pó. Segundo Grossmann & Kwiatkowski (2000), é um herbicida seletivo de baixa toxicidade ao
60 homem e aos animais (Classe III) e amplamente utilizado nas lavouras de arroz no Brasil. Há
61 regulamentação para a quantidade de glifosato e atrazina em ambientes naturais (Resol. CONAMA
62 nº357/2005), porém nenhuma legislação versa sobre o uso de quinclorac no Brasil e poucos estudos
63 foram publicados avaliando os efeitos deste agroquímico em espécies não-alvo, como os peixes
64 (Menezes et al., 2012; Moraes et al., 2007; Toni et al., 2013).

65 A análise do efeito dos xenobióticos em concentrações subletais é de extrema importância,
66 visto que muitos pesticidas não são eficazes e apresentam baixa toxicidade antes de serem
67 transformados em substâncias ativas metabolicamente tóxicas, como defende Fanta et al. (2003). Os
68 mesmos autores ainda salientam a importância de um alerta precoce sobre a nocividade destes
69 compostos, do conhecimento dos efeitos subletais e de suas implicações ecológicas, visto que muitos
70 destes poluentes permanecem no ambiente aquático em concentrações subletais até mesmo por
71 longos períodos de tempo, não sendo notados por não causarem mortalidade imediata de peixes.

72 Bianchini et al. (2006) explicitam que fluidos corpóreos, células e tecidos são a melhor forma
73 de indicação da presença de contaminantes. Eles destacam a utilização destes pois, para que se
74 possa detectar e avaliar o impacto de xenobióticos no ambiente, é importante observar as diferenças
75 nas formas dos organismos metabolizarem tais poluentes e não apenas avaliar a quantidade de
76 poluentes no ambiente e nos animais. Isso porque os xenobióticos são pouco metabolizados ou
77 eliminados, sendo acumulados ao longo das cadeias tróficas, encontrando-se em altas concentrações
78 apenas em tecidos de predadores de topo de cadeia (Bianchini et al., 2006; Livingstone, 1998).

79 *Rhamdia quelen* (Quoy e Gaimard, 1824) é uma espécie de peixe autóctone, distribuída do
80 México à Argentina (Reis et al., 2003), considerado onívoro generalista, no ambiente natural, e capaz
81 de sobreviver a alterações no ambiente aquático como variações de pH, dureza, amônia e oxigênio
82 (Gomes et al., 2000). Assim, é perfeitamente adaptado às diferentes estações climáticas,
83 sobrevivendo às baixas temperaturas no inverno, obtendo sucesso de crescimento, e reproduzindo-
84 se no verão. Possui ainda boa aceitação comercial, sendo uma espécie potencial para cultivo tanto
85 pela pesca quanto para a alimentação por sua carne possuir sabor agradável e excelentes
86 características para o processamento industrial (Barcellos et al., 2003).

87 Segundo Ahmad et al. (2000), os diversos poluentes ambientais, incluso os herbicidas,
88 ocasionam uma situação de estresse oxidativo em diversos organismos aquáticos, como os peixes,
89 devido a um aumento na produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROS), que são produzidas
90 mesmo na ausência de xenobióticos, e que as respostas variam não apenas entre as espécies, mas
91 também há respostas diferentes entre os tecidos de peixes, atribuídas às diferenças nos mecanismos
92 antioxidantes. Sies (1993) explicita que o estresse oxidativo pode ser definido como um desbalanço
93 entre os agentes pró-oxidantes e os antioxidantes, podendo ocorrer dano quando as quantidades de
94 pró-oxidantes são maiores, sendo chamado de estresse oxidativo. Uma vez produzidas, as EROS
95 podem modificar as macromoléculas celulares em busca de estabilidade através de ligações
96 químicas (Sies, 1993), muitas vezes levando a lesão cumulativa de tecidos e órgãos compostos
97 especialmente por proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (Lushchak & Bagnyukova, 2006).

98 Mesmo tendo o balanço oxidativo ainda muito discutido neste grupo taxonômico, sabe-se que
99 os peixes, assim como os demais organismos aeróbios, possuem um sistema antioxidante eficaz,
100 buscando proteger ou minimizar os danos ocasionados pelas EROS produzidas (Trenzado et al.,
101 2006; Zhang et al., 2008). Portanto, este estudo visou detectar possíveis alterações no balanço
102 oxidativo dos tecidos de indivíduos de *Rhamdia quelen* recém maturados sexualmente, frente a testes
103 de toxicidade aguda com duas concentrações de cada um dos herbicidas Roundup[®], Primoleo[®] e
104 Facet[®].

105

106 **Materiais e Métodos**

107 *Desenho experimental*

108 Para a escolha das concentrações dos herbicidas Roundup[®] e Primoleo[®] considerou-se as
109 concentrações publicadas como encontradas em corpos de água próximos de lavouras do sul do
110 Brasil. A legislação brasileira permite a presença de até 0,5 mg/L de glifosato e até 2 µg/L de atrazina
111 na água potável, segundo a Portaria brasileira nº 518/2004 do Ministério da Saúde do Brasil; e de 65
112 µg/L de glifosato e 2 µg/L de atrazina em corpos de água da classe II (águas doces onde ocorre
113 pesca ou cultivo de organismos, para fins de consumo intensivo, bem como atividades de recreação e
114 irrigação de locais com os quais o público possa vir a ter contato direto), segundo a Resolução nº
115 357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente. Já a Agência de Proteção Ambiental dos Estados

116 Unidos (USEPA) estabelece o valor de 700 µg/L e 3 µg/L como limite de glifosato e atrazina,
117 respectivamente, em água potável nas terras norte-americanas.

118 Como buscou-se trabalhar com concentrações subletais, similares às encontradas nas
119 lavouras, considerou-se também o trabalho de Queiroz et al. (2011), que encontrou valores entre 0,1
120 e 0,7 mg/L de glifosato em águas superficiais de áreas de cultivo de soja. Assim, as concentrações de
121 Roundup® utilizadas neste estudo foram de 18 e 72 µg/L (produto comercializado com 36% de
122 glifosato), estando dentro da faixa permitida pela para uso no Brasil e nos EUA, bem como sendo
123 inferior à encontrada em ambiente natural. Já para o Primoleo®, considerou-se o trabalho de Paulino
124 et al. (2012), que citam concentrações variando entre 0,2 µg/L e 1.000 µg/L nas águas adjacentes a
125 campos tratados, conforme publicado por Graymore et al. (2001), que elaboraram uma extensa
126 revisão bibliográfica com as concentrações publicadas para áreas naturais dos EUA e do Canadá.
127 Estes listam como concentração encontrada em campos de agricultura de Ohio até 24 µg/L de
128 atrazina, e até 88 µg/L deste princípio ativo nos reservatórios de água potável do país. Portanto, as
129 concentrações determinadas para uso neste trabalho foram de 10 e 15 µg/L de Primoleo® (vendido
130 com 50% de atrazina).

131 Para determinar a concentração do Facet®, que tem como princípio ativo o quinclorac,
132 considerou-se os valores publicados como existentes nas lavouras do sul do Brasil, posto que não há
133 legislação brasileira regulamentando o uso deste agroquímico. Deschamps et al. (2013) relatam
134 concentrações de quinclorac entre 2,11 e 20,2 µg/L em águas límnicas de cultivo de arroz, no sul do
135 Estado de Santa Catarina. Assim, foram estabelecidas para este estudo as concentrações de 1,75 e
136 14 µg/L do pó comercializado com 75% de quinclorac, a fim de testar uma concentração inferior a por
137 eles encontrada em ambiente natural, e outra dentro desta margem, para que se possam realizar
138 comparações entre o que está sendo utilizado atualmente e ainda detectar possíveis danos
139 acarretados mesmo em concentrações mais baixas.

140 Após a aquisição dos indivíduos adultos de *Rhamdia quelen* de uma piscicultura, estes
141 passaram por um período de aclimação, por sete dias, em aquários com aeração constante, pH
142 entre 6,7 e 7,2, salinidade de 0 psu, em local protegido de predadores, com temperatura e ciclo de luz
143 naturais e sendo alimentados uma vez ao dia, *ad libitum*, com a mesma ração que era ministrada na
144 piscicultura. Todos os indivíduos possuíam comprimento total acima de 18 cm, sendo assim
145 considerados adultos recém-maturados sexualmente (chamados alevinões) e aptos à reprodução,

146 posto que o comprimento de maturação sexual desta espécie é de 16,5 cm e 17,5 cm para machos e
147 fêmeas, respectivamente (Baldisserotto & Neto, 2004).

148 Após a aclimação, foi realizado o procedimento de exposição dos peixes aos agroquímicos,
149 sendo mantidos todos os parâmetros de cultivo da primeira etapa, apenas acrescido das
150 concentrações subletais introduzidas nos aquários. Cada grupo experimental foi composto por 24
151 indivíduos, tanto para os herbicidas como para o grupo-controle, que permaneceu todo o período sem
152 interação com nenhum herbicida. O procedimento experimental foi realizado em triplicata, totalizando
153 120 animais amostrados por herbicida.

154 O procedimento de exposição dos peixes aos herbicidas perdurou por sete dias, com os
155 mesmos parâmetros de cuidado do período de aclimação. Após, realizou-se a transecção de
156 medula espinhal nos animais, a pesagem dos animais em balança semi-analítica (precisão de 0,1 g)
157 e a medição do comprimento total com paquímetro digital (precisão 0,01 cm). Foram separados as
158 brânquias, o fígado, os rins e parte do músculo caudal (cerca de 1 cm²), de ambos os gêneros
159 (machos e fêmeas). Não foi realizada distinção entre os sexos para as análises dos tecidos devido a
160 discrepância entre o número de machos e fêmeas. Foram utilizados 36 indivíduos para cada
161 herbicida, perfazendo assim uma triplicata para os três agroquímicos, totalizando um *n* igual a 108
162 animais, estando o protocolo experimental autorizado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da
163 PUCRS, sob registro nº 11/00276.

164

165 *Ensaio enzimáticos*

166 Os tecidos foram imediatamente congelados, a -20°C, após serem retirados dos animais.
167 Todos foram pesados, em balança analítica (com precisão de 0,001 g) e homogeneizados em
168 solução de Buffer Fosfato (20 mM, pH 7,4, acrescida de PSMF 1 mM), em volume de nove vezes o
169 peso tecido, com o auxílio de aparelho microtritador (Turrax[®]). Todos os tecidos foram analisados
170 individualmente, pois todos possuíam tamanho suficiente para que se pudesse realizar as análises
171 em triplicata. Ainda, antes do ensaio enzimático, o homogeneizado foi centrifugado sob refrigeração
172 (4°C) a 3.000 rpm por 3 minutos, utilizando-se a interface para a análise do status oxidativo.

173 A enzima Superóxido Dismutase (SOD) teve sua atividade mensurada com adicionando-se
174 ao homogeneizado uma solução de tampão glicina (50 mM, pH 11, a 25°C), tendo a epinefrina como
175 catalisadora da reação enzimática, sendo esta preparada com 0,04 g de epinefrina (PM 333,33), 14

176 μL de HCl e 2 mL de água destilada (mantida em gelo e abrigada da luz). Através de cinética
177 espectrofotométrica, a 480 nm, foram realizadas 3 curvas com 5 pontos de leitura em cada, sendo a
178 primeira curva com 950 μL de tampão e 50 μL de homogeneizado, a segunda com 975 μL de tampão
179 e 25 μL de homogeneizado e a terceira com 990 μL de tampão e 10 μL de homogeneizado, sempre
180 totalizando 1.000 μL em cubeta de quartzo, mais 17 μL do preparado de epinefrina. O intervalo entre
181 as leituras foi de 60 segundos, obtendo-se uma curva com 5 pontos no total de 300 segundos. Estes
182 procedimentos foram realizados em temperatura ambiente, em triplicata, totalizando 3 curvas de cada
183 concentração de homogeneizado, portanto 9 curvas por amostra, conforme determinado por Misra &
184 Fridovich (1972).

185 Também por cinética espectrofotométrica mensurou-se a atividade da enzima Catalase (CAT,
186 conforme Boveris & Chance, 1973). Utilizou-se 955 μL de tampão fosfato (50 mM, pH 7,0, a 25°C), 10
187 μL do homogeneizado amostral e 35 μL de peróxido de hidrogênio (0,3 M, preparado com 170 μL de
188 H_2O_2 em 5 mL de água destilada), mantido sempre em gelo e abrigado da luz. As curvas
189 estabeleceram-se em temperatura ambiente, com 8 pontos distantes por 7 segundos cada,
190 totalizando 56 segundos, a 240 nm em cubeta de quartzo, com leituras em triplicata.

191 Através da quantificação das Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), mensurou-
192 se a lipoperoxidação (LPO). Para isto, seguiu-se o publicado por Buege & Aust (1978), adicionando-
193 se 100 μL de ácido tiobarbitúrico (TBA 0,67%), 150 μL de ácido tricloroacético (TCA 10%), 50 μL de
194 água destilada e 50 μL de amostra homogeneizada. Esta mistura foi aquecida a 100°C por 15
195 minutos e, para extrair o produto apolar da solução aquosa, acrescentou-se 300 μL de álcool n-
196 butílico. Foi realizada uma centrifugação por 10 minutos a 3.000 rpm, seguindo-se com as leituras
197 espectrofotométricas (em cubeta de quartzo preta, a 535 nm), em triplicata, do sobrenadante.

198 Foi realizada a medida das proteínas, no mesmo homogeneizado, através de kit comercial da
199 Labtest[®], por espectrofotometria a 545 nm, em triplicata. Com esta, pode-se mensurar a atividade da
200 SOD (expressa em unidades de SOD/mg de PT.min, sendo uma unidade de SOD correspondente a
201 quantidade de enzima que inibe em 50% a velocidade de oxidação do detector utilizado, neste caso a
202 epinefrina), da CAT (em pmoles de decomposição do H_2O_2 /mg de PT.min) e a lipoperoxidação (com
203 resultados expressos em nmoles de TBARS/mg de PT). Os produtos químicos e reagentes utilizados
204 possuíam alto grau de pureza e procedência garantida pelas empresas Merck[®] e Sigma-Aldrich[®].

205

206 *Análises estatísticas*

207 Os resultados foram analisados com o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificação da
208 normalidade; quando obteve-se valor de p maior que 0,05, seguiu-se com o teste de Levene para
209 verificar a homogeneidade e definir o teste complementar para ANOVA de uma via, sendo o teste da
210 Diferença Mínima Significativa (quando assume-se que as variâncias são iguais, com p maior que
211 0,05) ou pelo teste de Games-Howell (para variâncias iguais não-presumidas, com p menor que
212 0,05). Para os resultados que seguiram a hipótese alternativa (apresentando p menor que 0,05 na
213 verificação de normalidade, sendo assim considerados não paramétricos), fez-se uso do teste de
214 Kruskal-Wallis, complementado pelo teste Student-Newman-Keuls. Estas análises foram realizadas
215 nos programas IBM SPSS Statistics 20.0 e BioEstat 5.0, assumindo-se que o valor de significância de
216 p igual ou menor que 5% indica que há existência de relação entre as variáveis testadas (Zar, 2010).

217

218 **Resultados**

219 O tecido renal dos indivíduos de *Rhamdia quelen* foi o mais sensível à exposição ao herbicida
220 Roundup[®], apresentando aumento da atividade da catalase na concentração mais baixa (Fig. 17-H),
221 como também o aumento da lipoperoxidação nesta concentração (Fig. 17-I); e frente à concentração
222 mais alta observou-se um aumento da atividade da superóxido dismutase (Fig. 17-G). Já no tecido
223 muscular verificou-se apenas um aumento da atividade da catalase também na concentração mais
224 elevada deste herbicida (Fig. 17-J). Não houve alterações nos tecidos branquial (Fig. 17-A, B e C) e
225 hepático (Fig. 17-D, E e F), nem alterações nos níveis de TBARS no tecido muscular (Fig. 17-L).

226 O herbicida Primoleo[®] promoveu modificações no balanço oxidativo de todos os tecidos
227 analisados. Nas brânquias houve um aumento na atividade da catalase na concentração mais baixa
228 (Fig. 17-B), não havendo alteração na lipoperoxidação nesta situação experimental (Fig. 17-C). No
229 tecido hepático, nenhuma das enzimas antioxidantes apresentou alteração de sua atividade (Fig. 17-
230 D e E); contudo, foi detectada uma elevação nos níveis de TBARS nas duas concentrações testadas
231 (Fig. 17-F). O tecido renal apresentou aumento da atividade da SOD e da CAT na concentração mais
232 elevada (Fig. 17-G e H), como também um aumento da lipoperoxidação nesta situação experimental
233 (Fig. 17-I). Frente à concentração mais baixa, a superóxido dismutase manteve-se inalterada (Fig. 17-
234 G), com aumento da atividade da catalase (Fig. 17-H) e também da lipoperoxidação nos rins (Fig. 17-

235 I). No tecido muscular, apenas a superóxido dismutase apresentou alteração na sua atividade, com
236 redução nas duas concentrações testadas (Fig. 17-J).

237 PODE-SE OBSERVAR TAMBÉM ALTERAÇÕES EM TODOS OS TECIDOS ANALISADOS DOS PEIXES EXPOSTOS AO
238 FACET[®]. NO TECIDO BRANQUIAL, NENHUMA ENZIMA ANTIOXIDANTE ALTEROU SUA ATIVIDADE (FIG. 17-A E B),
239 PORÉM HOUVE AUMENTO DA LIPOPEROXIDAÇÃO FRENTE À CONCENTRAÇÃO MAIS ALTA DO AGROQUÍMICO (FIG. 17-
240 C). NO FÍGADO, A SUPERÓXIDO DISMUTASE REDUZIU SUA ATIVIDADE QUANDO OS INDIVÍDUOS FORAM EXPOSTOS À
241 CONCENTRAÇÃO MAIS BAIXA (FIG. 17-D). TANTO NO TECIDO HEPÁTICO COMO NO TECIDO RENAL, A CONCENTRAÇÃO
242 MAIS ALTA DO AGROQUÍMICO PROMOVEU UM AUMENTO NA ATIVIDADE DAS ENZIMAS SOD E CAT (FIG. 17-D, E,
243 G E H) E TAMBÉM O AUMENTO DA LIPOPEROXIDAÇÃO (FIG. 17-F E I). AINDA NO TECIDO RENAL, A CONCENTRAÇÃO
244 MAIS BAIXA PROMOVEU AUMENTO DA ATIVIDADE DA CATALASE (FIG. 17-H) E O AUMENTO DOS NÍVEIS MEDIDOS
245 DE TBARS (FIG. 17-I). JÁ NA MUSCULATURA, AS DUAS CONCENTRAÇÕES TESTADAS PROMOVERAM O AUMENTO DA
246 ATIVIDADE DA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASE (FIG. 17-J), SENDO QUE APENAS NA CONCENTRAÇÃO MAIS BAIXA
247 DETECTOU-SE AUMENTO NA LIPOPEROXIDAÇÃO (FIG. 17-L).

248

249 **Discussão**

250 Zhang et al. (2008) explicitam que, se a formação das Espécies Reativas de Oxigênio (EROS)
251 prevaleça sobre o sistema antioxidante, este desbalanço entre a formação e a remoção das EROS
252 pode provocar o estresse oxidativo. Ainda, a exposição a herbicidas pode induzir a uma excessiva
253 produção de EROS, a um ponto no qual as enzimas antioxidantes são incapazes de contrapor os
254 efeitos deletérios, resultando no dano oxidativo (Martínez-Cayuela, 1998). Podemos aferir com este
255 trabalho a ocorrência de dano oxidativo, sendo este tecido-específico. Confirma-se também que as
256 concentrações utilizadas neste estudo são todas subletais aos indivíduos da espécie *Rhamdia*
257 *quelen*, nesta fase do desenvolvimento, posto que não houve mortalidade durante o procedimento
258 experimental.

259 Podemos observar que o tecido branquial não foi prejudicado pelo herbicida Roundup[®]
260 quando consideramos os níveis de lipoperoxidação (LPO), sendo que o tecido renal foi o principal
261 sítio de ocorrência de dano oxidativo quando os animais são expostos a este agroquímico. Xing et al.
262 (2012) observaram dano cerebral e renal em carpas expostas ao inseticida Chlorpyrifos, utilizando
263 métodos enzimáticos e histológicos, e afirmam que peroxidação lipídica é o passo inicial para os
264 danos da membrana celular causada por agroquímicos, sendo considerada como um indicador do

265 dano oxidativo em componentes celulares. Ortiz et al. (2003) explicitam que o rim dos peixes recebe
266 a maior proporção de sangue pós-branquial, podendo-se considerar as lesões renais como bons
267 indicadores de poluição ambiental.

268 Os outros dois agroquímicos testados (Primoleo[®] e Facet[®]) produziram efeito sobre as
269 brânquias. O Primoleo[®] induziu a um aumento da atividade da catalase na concentração mais baixa,
270 aumento este possivelmente suficiente para impedir o dano oxidativo devido a não alteração dos
271 níveis de lipoperoxidação. Modesto & Martinez (2010) afirmam que os resultados publicados para a
272 atividade da catalase são bastante diversos. A catalase é considerada uma enzima de proteção
273 extremamente significativa para sistema antioxidante, sendo a enzima mais eficaz, dentre as
274 conhecidas, contra o estresse oxidativo severo (Matés, 2000). A catalase e a glutathiona peroxidase
275 são enzimas do sistema antioxidante que atuam de forma complementar, pois elas possuem
276 diferentes localizações celulares e moléculas alvo (Ballesteros et al., 2009). A glutathiona peroxidase
277 metaboliza os peróxidos orgânicos e inorgânicos e está localizada nas frações citosólicas e
278 mitocondriais (Ballesteros et al., 2009); já a catalase encontra-se nos peroxissomos e realiza a
279 detoxificação do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Zhang et al., 2004). Moraes (2008) afirma que uma
280 elevação da catalase nos níveis teciduais, em peixes, pode significar uma possível resposta
281 antioxidante do organismo, aspecto comprovado neste estudo durante a exposição a estes dois
282 agroquímicos.

283 Frente à exposição à concentração mais alta do Facet[®] observou-se um aumento da
284 lipoperoxidação no tecido branquial, após exposição ao herbicida, fato aliado a uma não alteração da
285 atividade das enzimas antioxidantes estudadas (SOD e CAT), configurando assim uma situação de
286 dano oxidativo. Tais resultados nos permitem sugerir que, concentrações mais altas destes
287 herbicidas, e/ou maior tempo de exposição, possam comprometer de maneira severa a integridade da
288 estrutura branquial, visto que, ao provocarem a peroxidação dos lipídeos de membrana, podem
289 comprometer a dinâmica de funcionamento desta estrutura, impedindo o seu perfeito funcionamento
290 como órgão respiratório e osmorregulatório. Sancho et al. (1998) apontam para uma possível
291 alteração na estrutura branquial, pois pesticidas em geral possuem a habilidade de romper a estrutura
292 deste tecido, levando a um menor aporte de oxigênio aos tecidos, a uma alteração nas concentrações
293 de gás carbônico circulante, como também a um desbalanço osmótico e ao prejuízo na eliminação da
294 excreta nitrogenada.

295 O mesmo padrão de incremento do TBARS e manutenção do nível de atividade das enzimas
296 antioxidantes foram observados no tecido hepático dos animais expostos ao Primoleo[®], nas duas
297 concentrações testadas. Ballesteros et al. (2009) também encontraram comportamento similar entre
298 brânquias e fígado, ao analisar peixes da espécie *Jenynsia multidentata* expostos ao endossulfan.
299 Modesto & Martinez (2010) explicam que muitas enzimas envolvidas no processo de defesa
300 antioxidante podem não ser capazes de alterar a sua atividade frente ao excesso de oxidantes. Os
301 autores exemplificam tal situação, pois a superóxido dismutase pode ter sua atividade modulada de
302 forma inibitória pelo excesso do peróxido de hidrogênio formado, a catalase pelo o ânion superóxido,
303 e sendo a glutathiona-S-transferase facilmente inativada pelos oxidantes em geral. Assim, podemos
304 sugerir que o excesso de oxidantes tenha modulado de forma inibitória o sistema enzimático da SOD
305 e da CAT, havendo incremento no TBARS e configurando estresse oxidativo.

306 Na concentração mais alta do herbicida Facet[®], observamos também a ocorrência de
307 estresse oxidativo no tecido hepático. Neste caso, o incremento da atividade do sistema antioxidante
308 enzimático (SOD e CAT) não foi suficiente para impedir o dano provocado pelas EROS, fato
309 comprovado pelo aumento da medida de TBARS neste tecido. O fígado é o órgão mais importante na
310 detoxificação de substâncias tóxicas (Dong et al., 2009) e possui uma alta atividade metabólica,
311 sendo o primeiro a reagir após uma situação de estresse (química ou não), mesmo se ocorrida num
312 curto espaço de tempo. Destaca-se também como o principal órgão de metabolização dos nutrientes,
313 sendo fundamental para a homeostase da glicemia, podendo ser considerado o órgão central do
314 metabolismo (Lehninger et al., 2002). Estes resultados, de aumento da atividade da catalase,
315 concordam com o observado por Pereira Maduenho & Martinez (2008) em fígados de *Prochilodus*
316 *lineatus* expostos a Diflubenzuron e por Moraes et al. (2007), que também observaram aumento da
317 CAT e da LPO em fígados de *Leporinus obtusidens* expostos aos herbicidas clomazone e propanil.

318 Ainda no tecido hepático, a superóxido dismutase apresentou uma redução de sua atividade
319 frente à concentração mais baixa do Facet[®]. Outra resposta de redução na atividade da superóxido
320 dismutase foi observada no tecido muscular frente às duas concentrações de Primoleo[®] utilizadas.
321 Ballesteros et al. (2009) explicam que observar um aumento nas enzimas antioxidantes após a
322 exposição aos xenobióticos não é uma regra geral, pois a atividade destas enzimas pode ser
323 aumentada ou inibida sob o estresse químico, dependendo da intensidade e da duração da tensão
324 aplicada, bem como da susceptibilidade da espécie exposta.

325 Nos rins, houve dano oxidativo com os três agroquímicos testados. Apenas quando expostos
326 à concentração mais alta do Roundup[®], a atividade da enzima superóxido dismutase parece ter sido
327 aumentada de maneira suficiente a impedir o dano oxidativo, posto que os níveis de lipoperoxidação
328 mantiveram-se inalterados. Já na concentração mais baixa do Roundup[®], bem como nas duas
329 concentrações do Primoleo[®] e do Facet[®], configurou-se dano oxidativo, pois o aumento das duas
330 enzimas antioxidantes (SOD e CAT) não foi suficiente para impedir um aumento da lipoperoxidação,
331 detectado pela elevação dos níveis de TBARS. Zocche et al. (2014) também relatam um aumento da
332 atividade da superóxido dismutase e da catalase em resposta a poluentes ambientais, destacando
333 que este sistema enzimático atua como uma primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo.
334 Pretto et al. (2011) encontraram aumento nos níveis de TBARS quando analisaram os rins da mesma
335 espécie de jundiá, porém quando expostos ao Cádmiio, sugerindo uma acumulação deste metal nas
336 brânquias, fígado e rins, em concentrações diferentes de acordo com o funcionamento do tecido,
337 necessitando de um longo período para a descontaminação do indivíduo.

338 Uma situação semelhante ocorreu nos rins dos indivíduos expostos às concentrações mais
339 baixas, dos três herbicidas, onde a atividade da superóxido dismutase não foi alterada, tendo
340 somente a catalase aumentado sua atividade, na tentativa de conter a formação das EROS, e assim
341 os possíveis danos provocados às membranas biológicas pelo incremento da lipoperoxidação.
342 Porém, tais respostas não foram suficientes para impedir o stress oxidativo, culminando em um
343 aumento nos níveis de TBARS. Sugere-se que mais estudos sejam realizados com este tecido frente
344 à exposição aos agroquímicos, buscando comparar os resultados aqui obtidos para *R. quelen*.

345 Neste estudo, no tecido muscular a superóxido dismutase apresentou-se aumentada em
346 ambas às concentrações de exposição ao Facet[®], já a catalase não apresentou um aumento
347 significativo em nenhuma das concentrações utilizadas deste agroquímico, apesar de observarmos
348 uma tendência clara de elevação. Como apontado por Stanic et al. (2006), o fluxo de ânion radical
349 superóxido pode levar a uma diminuição da atividade da catalase; assim, a ausência de um aumento
350 significativo desta e o aumento da atividade da superóxido dismutase, pode estar relacionada a um
351 incremento na formação de ânions do radical superóxido. Ballesteros et al. (2009) também não
352 detectaram alteração na atividade da catalase em brânquias, cérebro, rins e músculo de *Jenynsia*
353 *multidentata* expostas por 24 horas ao endosulfan.

354 Quanto ao dano oxidativo no tecido muscular, verificamos um aumento apenas na
355 concentração mais baixa do agroquímico Facet[®], pois na concentração mais elevada o mecanismo de
356 defesa antioxidante, principalmente pela mobilização da superóxido dismutase, foi capaz de impedir
357 um aumento do nível de lipoperoxidação. Frente ao herbicida Roundup[®], o aumento da catalase
358 parece impedir o dano oxidativo, pois não houve aumento nos níveis de TBARS. Nossos resultados
359 concordam com os obtidos por Toni et al. (2013), que mostram que o sistema de defesa antioxidante
360 dos peixes pode ser alterado, devido a diferente estratégia fisiológica frente ao estresse oxidativo
361 causado pela exposição à herbicidas. Isto mesmo em concentrações subletais, havendo modificações
362 teciduais, como acima, descrito para a concentração mais baixa de Facet[®].

363

364 **Conclusões**

365 Os tecidos hepático e renal foram os mais afetados, concordando com as informações
366 conhecidas sobre o papel destes órgãos na manutenção da homeostase dos indivíduos e nas
367 funções de metabolização e excreção dos xenobióticos. Estabelecendo-se uma hierarquia de
368 toxicidade entre os químicos testados, podemos inferir que o Facet[®] (quinclorac) foi o herbicida mais
369 tóxico aos indivíduos recém-maturados sexualmente de *Rhamdia quelen*, seguido do Primoleo[®]
370 (atrazina) e após o Roundup[®] (glifosato) (Facet[®]>Primoleo[®]>Roundup[®]). Faz-se necessário o
371 incremento de estudos que visem aprofundar o conhecimento dos mecanismos de ação destes
372 herbicidas em organismos não-alvo; assim como de delineamentos experimentais que mimetizem a
373 situação ambiental de exposição à combinação destes agroquímicos. Pode-se, a partir deste conjunto
374 de resultados, sugerir uma revisão na legislação vigente em nosso país, a fim de incluir produtos com
375 o princípio ativo quinclorac na lista de tóxicos a serem controlados no ambiente natural.

376

377 **Agradecimentos**

378 À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de
379 Pesquisa (CNPq) pelas bolsas de apoio concedidas.

380

381 **Conflitos de interesse**

382 Não há.

383

384

385 **Referências**

- 386 Ahmad, I., Hamid, T., Fatima, M., Chand, H. S., Jain, S. K., Athar, M., & Raisuddin, S. (2000). Induction of hepatic antioxidants
387 in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Biochimica et Biophysica*
388 *Acta*, 1523, 37–48.
- 389 Albinati, A. C. L., Moreira, E. L. T., Albinati, R. C. B., Carvalho, J. V., Santos, G. B., & Lira, A. D. (2007). Toxicidade aguda do
390 herbicida Roundup® para piauçu. *Revista Brasileira de Saúde E Produção Animal*, 8, 184–192.
- 391 Amarante Junior, O. P. de, Santos, T. C. R. dos, Brito, N. M., & Ribeiro, M. L. (2002). Glifosato: Propriedades, Toxicidade, Usos
392 E Legislação. *Química Nova*, 25(4), 589–593.
- 393 Baldisserotto, B., & Neto, J. R. (2004). *Criação de Jundiá* (p. 232). Santa Maria: Ed. UFSM.
- 394 Ballesteros, M. L., Wunderlin, D. a., & Bistoni, M. a. (2009). Oxidative stress responses in different organs of *Jenynsia*
395 *multidentata* exposed to endosulfan. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(1), 199–205.
396 doi:10.1016/j.ecoenv.2008.01.008
- 397 Barcellos, G., Kreutz, L. C., Rodrigues, L. B., Fioreze, I., Quevedo, R. M., Cericato, L., ... Terra, S. (2003). Haematological and
398 biochemical characteristics of *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard Pimelodidae): changes after acute stress. *Aquaculture*
399 *Research*, 34, 1465–1469.
- 400 Bianchini, A., Monserrat, J. M., & Ribeiro, C. A. de O. (2006). Biomarcadores de Poluição em Animais Aquáticos. In P. da C.
401 Lana, A. Bianchini, C. A. D. O. Ribeiro, L. F. H. Niencheski, G. Fillmann, & C. S. G. Santos (Eds.), *Avaliação ambiental de*
402 *estuários brasileiros: aspectos metodológicos* (p. 156). Rio de Janeiro: Museu Nacional.
- 403 Boveris, A., & Chance, B. (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochemistry Journal*, 134, 707–716.
- 404 Buege, J. A., & Aust, S. D. (1978). Microsomal lipids peroxidation. *Methods Enzymology*, 52, 302–310.
- 405 Carmo, D. A. do, Carmo, A. P. B. do, Pires, J. M. B., & Oliveira, J. L. M. (2013). Environmental behavior and toxicity of
406 herbicides atrazine and simazine. *Ambiente E Agua - An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, 8(1), 133–143.
407 doi:10.4136/ambi-agua.1073
- 408 Cavalcante, D. G. S. M., Martinez, C. B. R., & Sofia, S. H. (2008). Genotoxic effects of Roundup on the fish *Prochilodus*
409 *lineatus*. *Mutation Research*, 655(1-2), 41–6. doi:10.1016/j.mrgentox.2008.06.010
- 410 Conselho Nacional Do Meio Ambiente-Conama. Resolução No 357, de 17 de março de 2005. Ministério Do Meio Ambiente.
- 411 Deschamps, F. C., Marschalek, R., & Kleveston, R. (2013). Agrotóxicos Na Água Superficial Sugerem Melhorias. In *VIII*
412 *Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado*. Santa Maria.
- 413 Dong, X., Zhu, L., Wang, J., Xie, H., Hou, X., & Jia, W. (2009). Effects of atrazine on cytochrome P450 enzymes of zebrafish
414 (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 77(3), 404–412. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.06.052
- 415 Fanta, E., Rios, F. S., Romão, S., Vianna, a. C. C., & Freiburger, S. (2003). Histopathology of the fish *Corydoras paleatus*
416 contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54(2),
417 119–130.
- 418 Gluszcak, L. (2008). *Parâmetros toxicológicos em piavas (*Leporinus obtusidens*) e jundiás (*Rhamdia quelen*) após exposição a*
419 *uma formulação comercial de Glyphosate*. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA.
- 420 Gomes, L. de C., Golombieski, J. I., Gomes, A. R. C., & Baldisserotto, B. (2000). Biologia Do Jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei,
421 Pimelodidae), 179–185.
- 422 Graymore, M., Stagnitti, F., & Allinson, G. (2001). Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. *Environment International*, 26(7-8),
423 483–495. doi:10.1016/S0160-4120(01)00031-9
- 424 Grossmann, K., & Kwiatkowski, J. (2000). The Mechanism of Quinclorac Selectivity in Grasses. *Pesticide Biochemistry and*
425 *Physiology*, 66(2), 83–91. doi:10.1006/pest.1999.2461
- 426 Hayes, T. B., Anderson, L. L., Beasley, V. R., de Solla, S. R., Iguchi, T., Ingraham, H., ... Willingham, E. (2011).
427 Demasculinization and feminization of male gonads by atrazine: consistent effects across vertebrate classes. *The Journal of*
428 *Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 127(1-2), 64–73. doi:10.1016/j.jsbmb.2011.03.015

- 429 Hayes, T. B., Khoury, V., Narayan, A., Nazir, M., Park, A., Brown, T., ... Gallipeau, S. (2010). Atrazine induces complete
430 feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Proceedings of the National Academy*
431 *of Sciences of the United States of America*, 107(10), 4612–7. doi:10.1073/pnas.0909519107
- 432 Langiano, V. D. C., & Martinez, C. B. R. (2008). Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish
433 *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology: CBP*, 147(2), 222–31.
434 doi:10.1016/j.cbpc.2007.09.009
- 435 Lehninger, A. L., Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2002). *Princípios de Bioquímica* (3ª ed ed., p. 975 p.). São Paulo: Sarvier.
- 436 Livingstone, D. R. (1998). The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in
437 biotransformation by invertebrates and fish. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative*
438 *Physiology*, 120(1), 43–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9773498>
- 439 Lushchak, V. I., & Bagnyukova, T. V. (2006). Effects of different environmental oxygen levels on free radical processes in fish.
440 *Comparative Biochemistry and Physiology - B*, 44, 283– 289.
- 441 Marchesan, E. L. I. D. (2011). *Eficiência Agronômica E Comportamento De Formulações De Atrazina Com Taxas Distintas De*
442 *Liberação Em Latossolo Vermelho Distroférico*.
- 443 Martínez-Cayuela, M. (1998). Xenobiotic toxicity mediated by oxygen free radicals. *Ars Pharmaceutica*, 39(1), 1–13.
- 444 Matés, J. M. (2000). Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*,
445 153(1-3), 83–104. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11090949>
- 446 Menezes, C. C. de, Leitemperger, J., Santi, A., Lópes, T., Veiverberg, C. A., Peixoto, S., ... Loro, V. L. (2012). The effects of
447 diphenyl diselenide on oxidative stress biomarkers in *Cyprinus carpio* exposed to herbicide quinclorac (Facet®).
448 *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 81, 91–7. doi:10.1016/j.ecoenv.2012.04.022
- 449 Misra, H. P., & Fridovich, I. J. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for
450 superoxide dismutase. *Biol. Chem*, 247(10), 3170 – 3175.
- 451 Modesto, K. a, & Martinez, C. B. R. (2010). Roundup causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle
452 and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere*, 78(3), 294–9. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.10.047
- 453 Moraes, B. S. (2008). *Parâmetros Toxicológicos Em Carpas (Cyprinus carpio) Expostos A Formulações Comerciais De*
454 *Diferentes Herbicidas Em Condições De Lavoura De Arroz E Em Laboratório*. Universidade Federal de Santa Maria.
- 455 Moraes, B. S., Loro, V. L., Gluszczak, L., Pretto, A., Menezes, C., Marchezan, E., & de Oliveira Machado, S. (2007). Effects of
456 four rice herbicides on some metabolic and toxicology parameters of teleost fish (*Leporinus obtusidens*). *Chemosphere*,
457 68(8), 1597–601. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.03.006
- 458 Oliveira Jr., R. S. de, Guerra, N., Osipe, J. B., Franchini, L. H. M., Adegas, F. S., & Osipe, R. (2013). Herbicidas Registrados
459 para Uso e Resultados de Pesquisa. In J. Constantin, R. S. Oliveira Jr., & A. M. Oliveira Neto (Eds.), *Buva: Fundamentos e*
460 *Recomendações para Manejo* (1ª ed., pp. 65–90). Curitiba: Omnipax. doi:10.7436/2013.bfrm.0
- 461 Ortiz, J. B., García, M. L. G. de C., & Reiriz, M. C. S. (2003). Histopathological changes induced by lindane (g-hch) in various
462 organs of fishes. *Scientia Marina*, 67(1), 53–61.
- 463 Paulino, M. G., Sakuragui, M. M., & Fernandes, M. N. (2012). Effects of atrazine on the gill cells and ionic balance in a
464 neotropical fish, *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere*, 86(1), 1–7. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.08.033
- 465 Pereira Maduenho, L., & Martinez, C. B. R. (2008). Acute effects of diflufenuron on the freshwater fish *Prochilodus lineatus*.
466 *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology: CBP*, 148(3), 265–72.
467 doi:10.1016/j.cbpc.2008.06.010
- 468 Pretto, A., Loro, V. L., Baldisserotto, B., Pavanato, M. A., Moraes, B. S., Menezes, C., ... Dressler, V. (2011). Effects of water
469 cadmium concentrations on bioaccumulation and various oxidative stress parameters in *Rhamdia quelen*. *Archives of*
470 *Environmental Contamination and Toxicology*, 60(2), 309–18. doi:10.1007/s00244-010-9586-2
- 471 Queiroz, G. M. P., Silva, M. R. da, Bianco, R. J. F., Pinheiro, A., & Kaufmann, V. (2011). Transporte De Glifosato Pelo
472 Escoamento Superficial E Por Lixiviação Em Um Solo Agrícola. *Química Nova*, 34(2), 190–195.
- 473 Reis, R. E., Kullanser, S. O., & Ferraris Jr., C. J. (2003). *Check list of the freshwater fisher of south and Central America*. Porto
474 Alegre: EDIPUCRS.

- 475 Sancho, E., Ferrando, M. D., Fernández, C., & Andreu, E. (1998). Liver energy metabolism of *Anguilla anguilla* after exposure to
476 fenitrothion. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 41(2), 168–75. doi:10.1006/eesa.1998.1689
- 477 Sies, H. (1993). Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem*, 215, 213–219.
- 478 Soso, A. B., Barcellos, L. J. G., Ranzani-Paiva, M. J., Kreutz, L. C., Quevedo, R. M., Anziliero, D., ... Finco, J. A. (2007).
479 Chronic exposure to sub-lethal concentration of a glyphosate-based herbicide alters hormone profiles and affects
480 reproduction of female Jundiá (*Rhamdia quelen*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 23(3), 308–13.
481 doi:10.1016/j.etap.2006.11.008
- 482 Stanic, B., Andric, N., Zoric, S., Grubor-Lajsic, G., & Kovacevic, R. (2006). Assessing pollution in the Danube River near Novi
483 Sad (Serbia) using several biomarkers in sterlet (*Acipenser ruthenus* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 65(3),
484 395–402. doi:10.1016/j.ecoenv.2005.08.005
- 485 Toni, C., Menezes, C., Clasen, B., Leitemperger, J., Pretto, A., Adaime, M. B., ... Lucia Loro, V. (2013). Oxidative stress in carp
486 exposed to quinclorac herbicide under rice field condition. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 92, 27–31.
487 doi:10.1016/j.ecoenv.2013.01.028
- 488 Trenzado, C., Hidalgo, M. C., García-Gallego, M., Morales, A. E., Furné, M., Domezain, A., ... Sanz, A. (2006). Antioxidant
489 enzymes and lipid peroxidation in sturgeon *Acipenser naccarii* and trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study.
490 *Aquaculture*, 254(1-4), 758–767. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.11.020
- 491 Vidal, R. (1997). *Herbicidas: mecanismos de ação e resistência de plantas* (1ª ed., p. 165). Porto Alegre: Pallotti.
- 492 Xing, H., Li, S., Wang, Z., Gao, X., Xu, S., & Wang, X. (2012). Histopathological changes and antioxidant response in brain and
493 kidney of common carp exposed to atrazine and chlorpyrifos. *Chemosphere*, 88(4), 377–83.
494 doi:10.1016/j.chemosphere.2012.02.049
- 495 Zar, J. H. (2010). *Biostatistical Analysis* (5ª ed., p. 960 p.). Upper Saddle River: Pearson Prentice-Hall.
- 496 Zhang, J., Shen, H., Wang, X., Wu, J., & Xue, Y. (2004). Effects of chronic exposure of 2,4-dichlorophenol on the antioxidant
497 system in liver of freshwater fish *Carassius auratus*. *Chemosphere*, 55(2), 167–74. doi:10.1016/j.chemosphere.2003.10.048
- 498 Zhang, X., Yang, F., Zhang, X., Xu, Y., Liao, T., Song, S., & Wang, J. (2008). Induction of hepatic enzymes and oxidative stress
499 in Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*) exposed to waterborne hexabromocyclododecane (HBCDD). *Aquatic
500 Toxicology*, 86(1), 4–11. doi:10.1016/j.aquatox.2007.07.002
- 501 Zocche, J. J., Da Silva, L. A., Damiani, A. P., Mendonça, R. Á., Peres, P. B., Dos Santos, C. E. I., ... Pinho, R. A. (2014).
502 Heavy-metal content and oxidative damage in *Hypsiboas faber*. The impact of coal-mining pollutants on amphibians.
503 *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 66(1), 69–77. doi:10.1007/s00244-013-9949-6

504

505

506 **Figuras:**

507

508

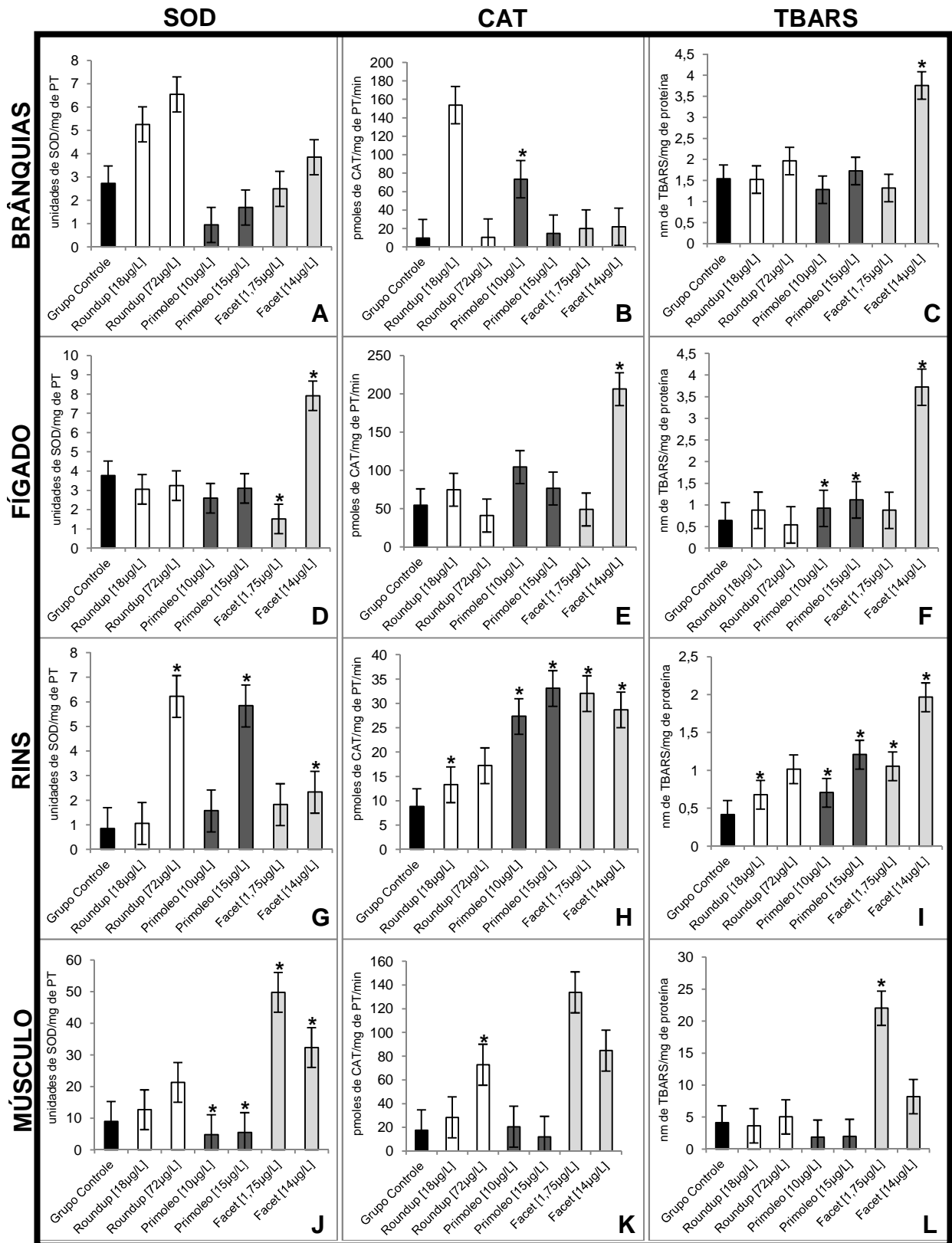


Figura 17. Resultados da atividade das enzima Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e medida de lipoperoxidação (TBARS) nos tecidos branquial (A, B e C), hepático (D, E e F), renal (G, H e I) e muscular (J, K e L) dos aleviões de *Rhamdia quelen*, expressos em média \pm erro padrão. O símbolo (*) identifica as diferenças significativas em relação ao grupo controle, com valor de $p < 0,05$.

CONCLUSÕES

Por realizar trocas com o ambiente, as brânquias são de extrema importância ao equilíbrio osmótico dos peixes de água doce (Storer & Usinger, 2000). Concordando com sua destacada importância e salientando que este é o primeiro órgão a entrar em contato com os xenobióticos dissolvidos na água, a composição bioquímica tecidual sofreu alterações significativas (especialmente nos níveis proteicos), podendo acarretar em danos neste tecido, conduzindo à perda da homeostase e podendo culminar na morte dos animais e/ou na diminuição do sucesso reprodutivo, quando expostos cronicamente a estas substâncias (como ocorre no ambiente natural) e nestas concentrações. O catabolismo de proteínas pode indicar uma resposta fisiológica do peixe para compensar a situação de estresse, sendo este metabólito essencial na composição do tecido branquial. O Facet[®] foi o herbicida que mais provocou o aumento da lipoperoxidação neste órgão, agredindo significativamente os indivíduos das duas faixas etárias da espécie estudada.

Os alevinões evidenciaram uma responsividade tecidual diferenciada quanto às alterações no perfil metabólico, sendo as brânquias e os rins os órgãos mais afetados com a exposição aos agroquímicos. Os tecidos hepático e renal sofreram aumento significativo nos níveis de TBARS, configurando estresse oxidativo destes. O tecido renal ainda é pouco referenciado em estudos bioquímicos, porém mostrou-se um excelente indicador de poluição ambiental, como proposto por Ortiz et al. (2003), por ser o órgão que recebe a maior parte de sangue após sua passagem pelas brânquias.

O tecido hepático, por sua vez, é muito utilizado em estudos ecotoxicológicos, por ser considerado o principal órgão de detoxificação de substâncias tóxicas (Dong et al., 2009); como possui uma alta atividade metabólica (elevado *turnover*), é o primeiro a reagir após uma situação de estresse (químico ou não), mesmo se ocorrida num curto espaço de tempo (Lehninger et al., 2002). Assim, pôde-se observar que houveram alterações no perfil metabólico deste órgão em todas as situações experimentais, em ambas faixas etárias, mesmo em um teste de exposição aguda por sete dias. Contudo, destaca-se a importância do uso dos rins para a análise do balanço oxidativo, tendo este apresentado maior sensibilidade à exposição aos xenobióticos.

Os alevinos passaram por diversas alterações em seu metabolismo, em todos os tecidos analisados; porém parecem ter conseguido modular suas enzimas a ponto de não sofrerem dano oxidativo frente aos herbicidas Roundup® e Primoleo®. O tecido muscular apresentou alterações em praticamente todos os metabólitos analisados quando os peixes foram expostos ao Primoleo® e ao Facet®, em ambas faixas etárias. Este órgão é o responsável pela força contrátil (Moyes & Schulte, 2010) e, se lesado, pode comprometer a movimentação do animal na coluna de água, influenciando diretamente na captura de oxigênio na superfície, na ingestão alimentar e na reprodução da espécie.

Fanta et al. (2003) salientam que as adaptações dos organismos expostos à concentrações subletais podem ser diferenciadas de acordo com a fase do ciclo de vida de cada espécie, bem como a capacidade de manutenção das populações em ambientes contaminados. Um dos objetivos iniciais do projeto era observar possíveis diferenças entre as duas faixas etárias de *Rhamida quelen* em questão. Com o contratempo da reforma estrutural ocorrida no edifício do *Vivário*, os procedimentos experimentais não puderam ocorrer de maneira idêntica para as duas idades dos indivíduos. Porém, mesmo sem podermos estabelecer uma comparação direta entre os dois experimentos, pode-se destacar uma nítida desigualdade no *status* oxidativo, visto que os alevinões sofreram mais com a exposição aos agroquímicos testados, fato evidenciado por uma maior atividade nas enzimas analisadas, bem como nos níveis de lipoperoxidação (TBARS).

Os procedimentos experimentais realizados com os alevinos (no prédio do *Vivário*) foram realizados com parâmetros ambientais controlados (ciclo de luz de 12 horas claro e 12 horas escuro; e temperatura controlada de $23\pm 1^{\circ}\text{C}$), enquanto os procedimentos dos alevinões foram à temperatura e luminosidade naturais, com temperatura média de $29\pm 3^{\circ}\text{C}$ (Accuweather Inc., 2014) e luminosidade de quase 15 horas de claro, devido ao horário de verão (Fig. 20).

Mesmo tendo sido realizados na mesma estação do ano (ambos experimentos no verão), houve diferença de temperatura entre os procedimentos. Lushchak (2011) explicita que o aumento da temperatura afeta todos os organismos vivos, estimulando todos os processos metabólicos de acordo com os princípios termodinâmicos conhecidos, e ainda relata que diversos autores detectaram estresse oxidativo em peixes, induzidos pela variação positiva da temperatura. Este

fator pode ter contribuído para que os aleviões tenham apresentado maiores níveis de TBARS e, conseqüentemente, maior lipoperoxidação quando somado ao estresse possivelmente provocado pelo agroquímico. Para que esta hipótese se comprove, faz-se necessário um novo estudo, comparando estes resultados obtidos com um procedimento experimental similar, com exposição aos agroquímicos e alterações na temperatura do ambiente. Assim, pode-se avaliar se a elevação da temperatura ambiental potencializa ou não o efeito do agroquímico.

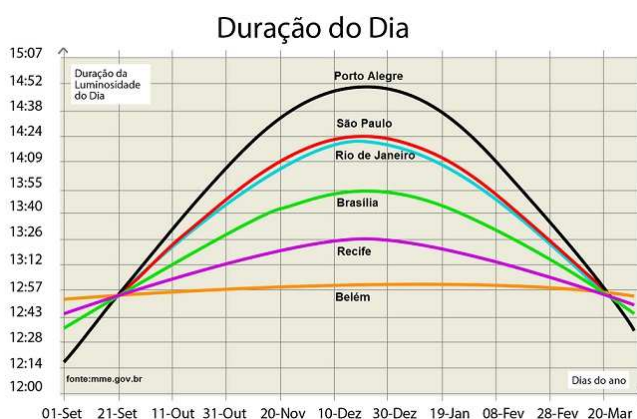


Figura 18. Gráfico do tempo de luminosidade durante o verão. Fonte: Ministério de Minas e Energia do Governo Federal

O Facet[®] (quinclorac) foi o herbicida mais tóxico aos indivíduos recém-maturados sexualmente, seguido do Primoleo[®] (atrazina) e após o Roundup[®] (glifosato). Destaca-se novamente que não há legislação vigente em nosso país que regulamente o uso de agroquímicos contendo o princípio ativo quinclorac. Mais estudos são necessários para ampliar o conhecimento a cerca do efeito deste xenobiótico em diferentes níveis taxonômicos, mas pode-se sugerir que este princípio ativo seja incluído como prejudicial à espécies não-alvo.

NORMAS DE PUBLICAÇÃO

Artigo 1: Archives of Environmental Contamination and Toxicology



Archives of Environmental Contamination and Toxicology

Editor-in-Chief: Peter S. Ross
ISSN: 0090-4341 (print version)
ISSN: 1432-0703 (electronic version)
Journal no. 244

2013 Impact Factor 1.960



Instructions for Authors

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
 - Use italics for emphasis.
 - Use the automatic page numbering function to number the pages.
 - Do not use field functions.
 - Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
 - Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
 - Use the equation editor or MathType for equations.
 - Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).
- Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.
- [LaTeX macro package \(zip, 182 kB\)](#)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols. Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

Scientific Style

- Please always use internationally accepted signs and symbols for units (SI units).
- Nomenclature: Insofar as possible, authors should use systematic names similar to those used by Chemical Abstract Service or IUPAC.
- Generic names of drugs and pesticides are preferred; if trade names are used, the generic name should be given at first mention.

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

- Journal article
Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8
Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of "et al" in long author lists will also be accepted:
Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325-329
- Article by DOI
Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086
- Book
South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London
- Book chapter
Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257
- Online document
Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007
- Dissertation
Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California
Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see
- [ISSN.org LTWA](http://www.issn.org/LTWA)
If you are unsure, please use the full journal title.
For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.
- [EndNote style \(zip, 2 kB\)](#)

Tables

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Artigo 2: Environmental Pollution

	<p>Environmental Pollution</p> <p><i>Environmental Pollution</i> is an international journal that seeks to publish papers that report results from original, novel research that addresses significant environmental pollution issues and problems...</p> <p>View full aims and scope</p> <p>Editor-in-Chief: W. Manning View full editorial board</p>	<p>Journal Metrics</p> <table border="1"><tr><td>Source Normalized Impact per Paper (SNIP): 1.912</td></tr><tr><td>SCImago Journal Rank (SJR): 1.974</td></tr><tr><td>Impact Factor: 3.902</td></tr><tr><td>5-Year Impact Factor: 4.306</td></tr></table>	Source Normalized Impact per Paper (SNIP): 1.912	SCImago Journal Rank (SJR): 1.974	Impact Factor: 3.902	5-Year Impact Factor: 4.306
Source Normalized Impact per Paper (SNIP): 1.912						
SCImago Journal Rank (SJR): 1.974						
Impact Factor: 3.902						
5-Year Impact Factor: 4.306						

Submission

Manuscript Submission

The complete manuscript can be submitted via EES at <http://www.ees.elsevier.com/envpol>, following all instructions exactly.

Complete manuscripts received via EES will be further evaluated by an Editor. Authors are requested to choose an editor most appropriate to their research field during the submission process. This final evaluation will determine whether or not a manuscript will be sent out for review.

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Please note that authors have a maximum of 6 weeks to resubmit a revised manuscript, unless an extension is requested from the editor.

The resubmission of previously rejected manuscripts is by invitation only.

Referees

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of five potential referees who are well-qualified to review the manuscript, if they are asked to review it. Reviewers are asked to evaluate the originality, significance and technical quality of the work, as well as the clarity of the manuscript, and the relevance of the subject matter to the journal. The final decision for publication of all manuscripts is made by the Editor-in-Chief.

Additional information

US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting ("Public Access") policy Elsevier facilitates author response to the NIH voluntary posting request (referred to as the NIH "Public Access Policy"; see <http://www.nih.gov/about/publicaccess/index.htm>) by posting the peer-reviewed author's manuscript directly to PubMed Central on request from the author, 12 months after formal publication. Upon notification from Elsevier of acceptance, we will ask you to confirm via e-mail (by e-mailing us at NIHauthorrequest@elsevier.com) that your work has received NIH funding and that you intend to respond to the NIH policy request, along with your NIH award number to facilitate processing. Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMed Central on your behalf a version of your manuscript that will include peer-review comments, for posting 12 months after formal publication. This will ensure that you will have responded fully to the NIH request policy. There will be no need for you to post your manuscript directly with PubMed Central, and any such posting is prohibited.

If excerpts from other copyrighted works are included, the Author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: contact ES Global Rights Department, P.O. Box 800, Oxford, OX5 1DX, UK; phone: (+44) 1865 843830, fax: (+44) 1865 853333, Elsevier's Rights Department, Oxford, UK: phone (+44) 1865 843830, fax (+44) 1865 853333, e-mail permissions@elsevier.com. Requests may also be completed on-line via the Elsevier homepage (<http://www.elsevier.com/locate/permissions>).

NEW SUBMISSIONS

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

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

References

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

Formatting requirements

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

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

Divide the article into clearly defined sections.

Please ensure your paper has consecutive line numbering - this is an essential peer review requirement.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file.

REVISED SUBMISSIONS

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Cover Letter

A cover letter must be sent with the manuscript and must include:

- The novelty, scientific significance and importance of the manuscript.
- The names and valid, current e-mail addresses for five (5) potential reviewers who are well-qualified to review the manuscript if they are asked to review it. Potential reviewers should be from the international scientific community and not from one country or region.
- The name and e-mail address of the corresponding author.

Article structure

Subdivision - unnumbered heads

Full Research Papers should not exceed 5000 words (including abstract but excluding references). If this is not possible, please contact the Editor in Chief.

Divide your article into clearly defined sections. Each subsection is given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. Subsections should be used as much as possible when cross-referencing text: refer to the subsection by heading as opposed to simply "the text".

Introduction

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

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

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

Conclusions

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

Essential title page information

Full Research Papers: Provide the following data on the title page (in the order given).

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

Abstract

A concise and factual abstract is required. (*maximum length 100-150 words*).

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

Capsule: In addition to the abstract for the manuscript, authors are required to submit a one- sentence statement that describes the significance of their work to the rest of the scientific community. When necessary, the capsule may be edited before publication.

Graphical abstract

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Keywords: Immediately after the abstract, provide a maximum of 5 keywords, avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. Note that these keywords will be used for indexing purposes.

Acknowledgements

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

Units

Units and symbols: The SI system should be used for all scientific and laboratory data: if in certain instance, it is necessary to quote other units, these should be added in parentheses. Temperatures should be given in degrees Celsius.

Footnotes

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

Table footnotes

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

Electronic artwork

General points

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

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

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

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the

resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):
EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.
TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.
TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.
TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

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

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Please note: Because of technical complications that can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

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

Tables

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

References

Responsibility for the accuracy of bibliographic citations lies entirely with the authors.

Citation in text

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

Reference links

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

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Reference management software

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

Reference formatting

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

Reference style

Name and year style in the text

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995). Kramer et al. (2000) have recently shown ..."

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters "a", "b", "c", etc., placed after the year of publication. Note that any (consistent) reference style and format may be used: the Publisher will ensure that the correct style for this journal will be introduced for the proof stages, the final print version and the PDF files for electronic distribution.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2000. The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communications* 163, 51-59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 1979. *The Elements of Style*, third ed. Macmillan, New York. Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 1999. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281-304.

Artigo 3: Ecotoxicology and Environmental Safety

 <p>ECOTOXICOLOGY ENVIRONMENTAL SAFETY</p> <p>Supports Open Access</p>	<h3>Ecotoxicology and Environmental Safety</h3> <p><i>Ecotoxicology and Environmental Safety</i> focuses on integrated mechanistic research related to short- and long-term pathways and interactions of substances and chemical mixtures in environmental systems...</p> <p>View full aims and scope</p> <p>Editor: K. Kannan View full editorial board</p>	<h3>Journal Metrics</h3> <table border="1"><tr><td>Source Normalized Impact per Paper (SNIP): 1.291</td></tr><tr><td>SCImago Journal Rank (SJR): 1.134</td></tr><tr><td>Impact Factor: 2.482</td></tr><tr><td>5-Year Impact Factor: 2.715</td></tr></table>	Source Normalized Impact per Paper (SNIP): 1.291	SCImago Journal Rank (SJR): 1.134	Impact Factor: 2.482	5-Year Impact Factor: 2.715
Source Normalized Impact per Paper (SNIP): 1.291						
SCImago Journal Rank (SJR): 1.134						
Impact Factor: 2.482						
5-Year Impact Factor: 2.715						

NEW SUBMISSIONS

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

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

References

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

Formatting requirements

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

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

Please ensure your paper has consecutive line numbering - this is an essential peer review requirement.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file.

REVISED SUBMISSIONS

Use double spacing. All pages must be numbered, beginning with the abstract. All lines must be numbered, preferably continuously throughout the entire manuscript.

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

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

Introduction

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

Material and methods

Materials and methods should be sufficiently detailed to enable the experiments to be reproduced. It is mandatory to give formal assurance that any study involving humans or experimental animals were conducted in accordance with national and institutional guidelines for the *protection of human subjects and animal welfare*. No manuscript will be considered unless this information is supplied.

Theory/calculation

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

Results/Discussion

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

Conclusions

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

Appendices

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

Essential title page information

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

Abstract

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

Graphical abstract

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

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

Abbreviations

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

Acknowledgements

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

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI. Specially please note, the values reported on research papers should be limited to 3 significant figures, unless required otherwise. ppm or ppb are not accepted and this should be presented as mg/kg or $\mu\text{g}/\text{kg}$. Centrifugation speed should be presented in x g, not rpm.

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

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

Table footnotes

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

Artwork

Electronic artwork

General points

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

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

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

Formats

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

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

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

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

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

Please do not:

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

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together

with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Please note: Because of technical complications that can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

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

Text graphics

Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. See further under Electronic artwork.

Tables

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

References

Citation in text

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

All citations in the text should refer to:

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

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

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

Reference links

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

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

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

Reference formatting

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

Reference style

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

Examples:

Reference to a journal publication:

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

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York. Reference to a chapter in an edited book:

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

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations: <http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Data at PANGAEA

Electronic archiving of supplementary data enables readers to replicate, verify and build upon the conclusions published in your paper. We recommend that data should be deposited in the data library PANGAEA (<http://www.pangaea.de>). Data are quality controlled and archived by an editor in standard machine-readable formats and are available via Open Access. After processing, the author receives an identifier (DOI) linking to the supplements for checking. As your data sets will be citable you might want to refer to them in your article. In any case, data supplements and the article will be automatically linked as in the following example: [doi:10.1016/0016-7037\(95\)00105-9](https://doi.org/10.1016/0016-7037(95)00105-9). Please use PANGAEA's web interface to submit your data (<http://www.pangaea.de/submit/>).

Interactive plots

This journal encourages you to include data and quantitative results as interactive plots with your publication. To make use of this feature, please include your data as a CSV (comma-separated values) file when you submit your manuscript. Please refer to <http://www.elsevier.com/interactiveplots> for further details and formatting instructions.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

REFERÊNCIAS

AccuWeather Inc. (2014). www.accuweather.com.

- Ahmad, I., Hamid, T., Fatima, M., Chand, H. S., Jain, S. K., Athar, M., & Raisuddin, S. (2000). Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1523, 37–48.
- Albinati, A. C. L., Moreira, E. L. T., Albinati, R. C. B., Carvalho, J. V., De Lira, A. D., Santos, G. B., & Vidal, L. V. O. (2009). Biomarcadores histológicos - toxicidade crônica pelo Roundup em piaçu (*Leporinus macrocephalus*). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária E Zootecnia*, 61(3), 621–627.
- Albinati, A. C. L., Moreira, E. L. T., Albinati, R. C. B., Carvalho, J. V., Santos, G. B., & Lira, A. D. (2007). Toxicidade aguda do herbicida Roundup® para piaçu. *Revista Brasileira de Saúde E Produção Animal*, 8, 184–192.
- Almroth, B. C., Sturve, J., Berglund, A., & Förlin, L. (2005). Oxidative damage in eelpout (*Zoarces viviparus*), measured as protein carbonyls and TBARS, as biomarkers. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 73(2), 171–80. doi:10.1016/j.aquatox.2005.03.007
- Amarante Junior, O. P. De, Santos, T. C. R. Dos, Brito, N. M., & Ribeiro, M. L. (2002). Glifosato: Propriedades, Toxicidade, Usos E Legislação. *Química Nova*, 25(4), 589–593.
- Aminov, A. I., Golovanova, I. L., & Filippov, A. A. (2014). Effect of the herbicide Roundup on the activity of Glycosidases of invertebrates and juvenile fish. *Inland Water Biology*, 6(4), 351–356. doi:10.1134/S1995082913040032
- Annett, R., Habibi, H. R., & Hontela, A. (2014). Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. *Journal of Applied Toxicology*, 34(5), 458–479. doi:10.1002/jat.2997
- Atli, G., & Canli, M. (2007). Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 145(2), 282–287. doi:10.1016/j.cbpc.2006.12.012
- Azevedo, V. C. (2013). Efeito da exposição à atrazina nas brânquias de *Poecilia vivipara* aclimatados a diferentes salinidades. *Universidade Federal de São Carlos*, Dissertação de Mestrado.
- Baldisserotto, B., & Neto, J. R. (2004). *Criação de Jundiá* (p. 232). Santa Maria: Ed. UFSM.
- Ballesteros, M. L., Durando, P. E., Nores, M. L., Díaz, M. P., Bistoni, M. a., & Wunderlin, D. a. (2009). Endosulfan induces changes in spontaneous swimming activity and acetylcholinesterase activity of *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes). *Environmental Pollution*, 157(5), 1573–1580. doi:10.1016/j.envpol.2009.01.001
- Ballesteros, M. L., Wunderlin, D. a., & Bistoni, M. a. (2009). Oxidative stress responses in different organs of *Jenynsia multidentata* exposed to endosulfan. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(1), 199–205. doi:10.1016/j.ecoenv.2008.01.008
- Barcellos, G., Kreutz, L. C., Rodrigues, L. B., Fioreze, I., Quevedo, R. M., Cericato, L., ... Terra, S. (2003). Haematological and biochemical characteristics of *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard Pimelodidae): changes after acute stress. *Aquaculture Research*, 34, 1465–1469.
- Becker, A. G., Moraes, B. S., Menezes, C. C., Loro, V. L., Santos, D. R., Reichert, J. M., & Baldisserotto, B. (2009). Pesticide contamination of water alters the metabolism of juvenile silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(6), 1734–1739. doi:10.1016/j.ecoenv.2009.01.006

- Bianchini, A., Monserrat, J. M., & Ribeiro, C. A. de O. (2006). Biomarcadores de Poluição em Animais Aquáticos. In P. da C. Lana, A. Bianchini, C. A. D. O. Ribeiro, L. F. H. Niencheski, G. Fillmann, & C. S. G. Santos (Eds.), *Avaliação ambiental de estuários brasileiros: aspectos metodológicos* (p. 156). Rio de Janeiro: Museu Nacional.
- Bidinotto, P. M., Souza, R. H. S., & Moraes, G. (1997). Hepatic glycogen in eight tropical fresh water teleost fish: A procedure for field determinations of micro samples. *Bol. Téc. CEPTA, Pirassununga*, 10, 53–60.
- Bortoluzzi, E. C., Rheinheimer, D. D. S., Gonçalves, C. S., Pellegrini, J. B. R., Zanella, R., & Copetti, A. C. C. (2006). Contaminação de águas superficiais por agrotóxicos em função do uso do solo numa microbacia hidrográfica de Agudo, RS. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola E Ambiental*, 10(4), 881–887.
- Boveris, A., & Chance, B. (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochemistry Journal*, 134, 707–716.
- Brausch, J. M., & Smith, P. N. (2007). Toxicity of three polyethoxylated tallowamine surfactant formulations to laboratory and field collected fairy shrimp, *Thamnocephalus platyurus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 52(2), 217–21. doi:10.1007/s00244-006-0151-y
- Brum, A., Dotta, G., Roubledakis, K., Gonçalves, E. L. T., Garcia, L. P., Garcia, P., ... Martins, M. L. (2014). Hematological and histopathological changes in silver catfish *Rhamdia quelen* (Siluriformes) exposed to clomazone herbicide in the Madre River, Santa Catarina State, Southern Brazil. *Journal of Environmental Science and Health. Part. B, Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 49(3), 169–75. doi:10.1080/03601234.2014.858007
- Buege, J. A., & Aust, S. D. (1978). Microsomal lipids peroxidation. *Methods Enzymology*, 52, 302–310.
- Canadian Council of Ministers of the Environment. (1999). Canadian water quality guidelines for the protection of agricultural water uses: Atrazine. In *Canadian environmental quality guidelines* (pp. 1–3). Winnipeg: Manitoba Statutory Publications.
- Carmo, D. A. do, Carmo, A. P. B. do, Pires, J. M. B., & Oliveira, J. L. M. (2013). Environmental behavior and toxicity of herbicides atrazine and simazine. *Ambiente E Agua - An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, 8(1), 133–143. doi:10.4136/ambi-agua.1073
- Carneiro, P. C. F., & Mikos, J. D. (2005). Frequência alimentar e crescimento de alevinos de jundiá. *Ciência Rural*, 35(1), 187–191.
- Cavalcante, D. G. S. M., Martinez, C. B. R., & Sofia, S. H. (2008). Genotoxic effects of Roundup on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutation Research*, 655(1-2), 41–6. doi:10.1016/j.mrgentox.2008.06.010
- Cericato, L., Machado, J. G., Fagundes, M., Kreutz, L. C., Quevedo, R. M., Finco, J., ... Barcellos, L. J. G. (2008). Cortisol response to acute stress in jundiá *Rhamdia quelen* acutely exposed to sub-lethal concentrations of agrichemicals. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology*, 148(3), 281–286. doi:10.1016/j.cbpc.2008.06.008
- Cericato, L., Neto, J. G. M., Kreutz, L. C., Quevedo, R. M., da Rosa, J. G. S., Koakoski, G., ... 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. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 149(3), 363–367. doi:10.1016/j.cbpc.2008.09.002
- Conselho Nacional Do Meio Ambiente-CONAMA. Resolução No 357, de 17 de Março de 2005. Ministério Do Meio Ambiente.

- Deschamps, F. C., Marschalek, R., & Kleveston, R. (2013). Agrotóxicos Na Água Superficial Sugerem Melhorias. In *VIII Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado*. Santa Maria.
- Dong, X., Zhu, L., Wang, J., Xie, H., Hou, X., & Jia, W. (2009). Effects of atrazine on cytochrome P450 enzymes of zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 77(3), 404–412. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.06.052
- Dores, E. F. G. de C., & De-Lamonica-Freire, E. M. (2001). Contaminação Do Ambiente Aquático Por Pesticidas. Estudo De Caso: Águas Usadas Para Consumo Humano Em Primavera Do Leste, Mato Grosso – Análise Preliminar. *Química Nova*, 24(1), 27–36.
- Dornelles, M. F., & Oliveira, G. T. (2014). Effect of atrazine, glyphosate and quinclorac on biochemical parameters, lipid peroxidation and survival in bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 66(3), 415–29. doi:10.1007/s00244-013-9967-4
- Fanta, E., Rios, F. S., Romão, S., Vianna, a. C. C., & Freiburger, S. (2003). Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54(2), 119–130.
- Fausch, K. D., Lyons, J., Karr, J. R., & Angermeier, P. L. (1990). Fish communities as indicators of environmental degradation. In *American Fisheries Society Symposium* 8 (pp. 123–144).
- Fernández-Vega, C., Sancho, E., Ferrando, M. D., & Andreu, E. (2002). Thiobencarb-Induced Changes in Acetylcholinesterase Activity of the Fish *Anguilla anguilla*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 72(1), 55–63. doi:10.1006/pest.2001.2581
- Ferreira, D., Motta, A. C. da, Kreutz, L. C., Toni, C., Loro, V. L., & Barcellos, L. J. G. (2010). Assessment of oxidative stress in *Rhamdia quelen* exposed to agrichemicals. *Chemosphere*, 79(9), 914–921. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.03.024
- Folch, J., Lees, M., & Stanley, G. H. S. (1957). A Simple Method For The Isolation And Purification Of Total Lipides From Animal Tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226, 497–509.
- Fonseca, M. B. da, Gluszczak, L., Moraes, B. S., de Menezes, C. C., Pretto, A., Tierno, M. A., ... Loro, V. L. (2008). The 2,4-D herbicide effects on acetylcholinesterase activity and metabolic parameters of piava freshwater fish (*Leporinus obtusidens*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 69(3), 416–20. doi:10.1016/j.ecoenv.2007.08.006
- Frings, C., & Dunn, R. (1970). A colorimetric method for determination of total serum lipids based on the sulfophosphovanillin reaction. *American Journal of Clinical Pathology*, 53, 89–91.
- Giesy, J. P., Dobson, S., & Solomon, K. R. (2000). Ecotoxicological Risk Assessment for Roundup Herbicide. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 167, 35–120.
- Gluszczak, L. (2008). *Parâmetros toxicológicos em piavas (*Leporinus obtusidens*) e jundiás (*Rhamdia quelen*) após exposição a uma formulação comercial de Glyphosate*. Universidade Federal De Santa Maria, Tese de Doutorado.
- Gluszczak, L., dos Santos Miron, D., Crestani, M., Braga da Fonseca, M., de Araújo Pedron, F., Duarte, M. F., & Vieira, V. L. P. (2006). Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 65(2), 237–241. doi:10.1016/j.ecoenv.2005.07.017
- Gluszczak, L., Miron, D. 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*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology: CBP*, 146(4), 519–24. doi:10.1016/j.cbpc.2007.06.004

- Gomes, L. de C., Golombieski, J. I., Gomes, A. R. C., & Baldisserotto, B. (2000). Biología do Jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae), 179–185.
- Graymore, M., Stagnitti, F., & Allinson, G. (2001). Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. *Environment International*, 26(7-8), 483–495. doi:10.1016/S0160-4120(01)00031-9
- Griboff, J., Morales, D., Bertrand, L., Bonansea, R. I., Monferrán, M. V., Asis, R., ... Amé, M. V. (2014). Oxidative stress response induced by atrazine in *Palaemonetes argentinus*: The protective effect of vitamin E. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 108, 1–8. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.06.025
- Grossmann, K., & Kwiatkowski, J. (2000). The Mechanism of Quinclorac Selectivity in Grasses. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 66(2), 83–91. doi:10.1006/pest.1999.2461
- Harvey, R. A., & Ferrier, D. R. (2012). *Bioquímica Ilustrada* (p. 520). Porto Alegre: Artmed.
- Hayes, T. B., Anderson, L. L., Beasley, V. R., de Solla, S. R., Iguchi, T., Ingraham, H., ... Willingham, E. (2011). Demasculinization and feminization of male gonads by atrazine: consistent effects across vertebrate classes. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 127(1-2), 64–73. doi:10.1016/j.jsbmb.2011.03.015
- Hayes, T. B., Khoury, V., Narayan, A., Nazir, M., Park, A., Brown, T., ... Gallipeau, S. (2010). Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(10), 4612–7. doi:10.1073/pnas.0909519107
- Hill, R. W., Wyse, G. A., & Anderson, M. (2012). *Fisiologia animal* (p. 894). Porto Alegre: Artmed.
- Hued, A. C., & Bistoni, M. D. L. Á. (2005). Development and validation of a Biotic Index for evaluation of environmental quality in the central region of Argentina. *Hydrobiologia*, 543(1), 279–298. doi:10.1007/s10750-004-7893-1
- Islam, M. O., Hara, M., & Miyake, J. (2002). Induction of P-glycoprotein, glutathione-S-transferase and cytochrome P450 in rat liver by atrazine. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 12(1), 1–6. doi:10.1016/S1382-6689(01)00121-1
- Jasper, R., Locatelli, G. O., Pilati, C., & Locatelli, C. (2012). Evaluation of biochemical, hematological and oxidative parameters in mice exposed to the herbicide glyphosate-Roundup®. *Interdisciplinary Toxicology*, 5(3), 133–40. doi:10.2478/v10102-012-0022-5
- Jin, Y., Zhang, X., Shu, L., Chen, L., Sun, L., Qian, H., ... Fu, Z. (2010). Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposure in adult female zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 78(7), 846–52. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.11.044
- Koakoski, G., Quevedo, R. M., Ferreira, D., Oliveira, T. A., da Rosa, J. G. S., de Abreu, M. S., ... Barcellos, L. J. G. (2014). Agrichemicals chronically inhibit the cortisol response to stress in fish. *Chemosphere*, 112, 85–91. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.02.083
- Kochhann, D., Pavanato, M. a, Llesuy, S. F., Correa, L. M., Konzen Riffel, A. P., Loro, V. L., ... Baldisserotto, B. (2009). Bioaccumulation and oxidative stress parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to different thorium concentrations. *Chemosphere*, 77(3), 384–91. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.07.022
- Landys, M. M., Piersma, T., Guglielmo, C. G., Jukema, J., Ramenofsky, M., & Wingfield, J. C. (2005). Metabolic profile of long-distance migratory flight and stopover in a shorebird. *Proceedings of The Royal Society B*, 272, 295–302. doi:10.1098/rspb.2004.2952

- Langiano, V. D. C., & Martinez, C. B. R. (2008). Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology: CBP*, 147(2), 222–31. doi:10.1016/j.cbpc.2007.09.009
- Law, K., & Brunt, E. M. (2010). Nonalcoholic fatty liver disease. *Clinics in Liver Disease*, 14(4), 591–604. doi:10.1016/j.cld.2010.07.006
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2002). *Princípios de Bioquímica* (3^a ed ed., p. 975 p.). São Paulo: Sarvier.
- Livingstone, D. R. (1998). The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*, 120(1), 43–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9773498>
- Livingstone, D. R. (2001). Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine Pollution Bulletin*, 42(8), 656–66. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11525283>
- Lushchak, V. I. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 101(1), 13–30. doi:10.1016/j.aquatox.2010.10.006
- Lushchak, V. I., & Bagnyukova, T. V. (2006). Effects of different environmental oxygen levels on free radical processes in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology - B*, 44, 283–289.
- Marchesan, E. L. I. D. (2011). *Eficiência Agrônômica E Comportamento De Formulações De Atrazina Com Taxas Distintas De Liberação Em Latossolo Vermelho Distroférico*.
- Marchesan, E., Zanella, R., Avila, L. A. De, Camargo, E. R., Machado, S. L. de O., & Macedo, V. R. M. (2007). Rice Herbicide Monitoring In Two Brazilian Rivers During The Rice Growing Season. *Sci. Agric.*, 64(2), 131–137.
- Martínez-Cayuela, M. (1998). Xenobiotic toxicity mediated by oxygen free radicals. *Ars Pharmaceutica*, 39(1), 1–13.
- Matés, J. M. (2000). Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*, 153(1-3), 83–104. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11090949>
- Mela, M., Guiloski, I. C., Doria, H. B., Randi, M. a F., de Oliveira Ribeiro, C. a, Pereira, L., ... Silva de Assis, H. C. (2013). Effects of the herbicide atrazine in neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 93, 13–21. doi:10.1016/j.ecoenv.2013.03.026
- Mela, M., Randi, M. a F., Ventura, D. F., Carvalho, C. E. V, Pelletier, E., & Oliveira Ribeiro, C. a. (2007). Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 68(3), 426–35. doi:10.1016/j.ecoenv.2006.11.013
- Menezes, C., Fonseca, M. B., Leitemperger, J., Pretto, A., Moraes, B. S., Murussi, C. R., ... Loro, V. L. (2014). Commercial formulation containing 2,4-D affects biochemical parameters and morphological indices of silver catfish exposed for 90 days. *Fish Physiology and Biochemistry*. doi:10.1007/s10695-014-9985-9
- Menezes, C., Leitemperger, J., Murussi, C., Toni, C., Araújo, M. D. C. S., Farias, I. L., ... Loro, V. L. (2014). Herbicide clomazone effects on δ-aminolevulinic acid activity and metabolic parameters in *Cyprinus carpio*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 92(4), 393–8. doi:10.1007/s00128-014-1229-2

- Menezes, C. C. De. (2010). *Parâmetros de estresse oxidativo em jundiás (*Rhamdia quelen*) expostos a formulações comerciais dos herbicidas glifosato e clomazone*. Universidade Federal De Santa Maria, Dissertação de Mestrado.
- Menezes, C. C. de, Fonseca, M. B. de, Loro, V. L., Santi, A., Cattaneo, R., Clasen, B., ... Morsch, V. M. (2011). Roundup effects on oxidative stress parameters and recovery pattern of *Rhamdia quelen*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 60(4), 665–71. doi:10.1007/s00244-010-9574-6
- Menezes, C. C. de, Leitemperger, J., Santi, A., Lópes, T., Veiverberg, C. A., Peixoto, S., ... Loro, V. L. (2012). The effects of diphenyl diselenide on oxidative stress biomarkers in *Cyprinus carpio* exposed to herbicide quinclorac (Facet®). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 81, 91–7. doi:10.1016/j.ecoenv.2012.04.022
- Miron, D. D. S., Crestani, M., Rosa Shettinger, M., Maria Morsch, V., Baldisserotto, B., Angel Tierno, M., ... Vieira, V. L. P. (2005). Effects of the herbicides clomazone, quinclorac, and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 61(3), 398–403. doi:10.1016/j.ecoenv.2004.12.019
- Misra, H. P., & Fridovich, I. J. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Biol. Chem*, 247(10), 3170 – 3175.
- Modesto, K. a, & Martinez, C. B. R. (2010). Roundup causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere*, 78(3), 294–9. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.10.047
- Moraes, B. S. (2008). *Parâmetros Toxicológicos em Carpas (*Cyprinus carpio*) Expostos a Formulações Comerciais de Diferentes Herbicidas em Condições de Lavoura de Arroz e Em Laboratório*. Universidade Federal de Santa Maria, Dissertação de Mestrado.
- Moraes, B. S., Loro, V. L., Gluszczak, L., Pretto, A., Menezes, C., Marchezan, E., & de Oliveira Machado, S. (2007). Effects of four rice herbicides on some metabolic and toxicology parameters of teleost fish (*Leporinus obtusidens*). *Chemosphere*, 68(8), 1597–601. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.03.006
- Moura, E. E. S. de. (2009). *Determinação da toxicidade aguda e caracterização de risco ambiental do herbicida Roundup (glifosato) sobre três espécies de peixes*. Universidade Federal Do Rio Grande Do Norte, Dissertação de Mestrado.
- Moyes, C. D., & Schulte, P. M. (2010). *Princípios de Fisiologia Animal* (p. 792 p.). Porto Alegre: Artmed.
- Navarro, C. D. C., & Martinez, C. B. R. (2014). Effects of the surfactant polyoxyethylene amine (POEA) on genotoxic, biochemical and physiological parameters of the freshwater teleost *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology: CBP*, 165, 83–90. doi:10.1016/j.cbpc.2014.06.003
- Nunes, B., Caldeira, C., Pereira, J. L., Gonçalves, F., & Correia, A. T. (2014). Perturbations in ROS-related processes of the fish *Gambusia holbrooki* after acute and chronic exposures to the metals copper and cadmium. *Environmental Science and Pollution Research*. doi:10.1007/s11356-014-3580-6
- Oliveira Jr., R. S. de, Guerra, N., Osipe, J. B., Franchini, L. H. M., Adegas, F. S., & Osipe, R. (2013). Herbicidas Registrados para Uso e Resultados de Pesquisa. In J. Constantin, R. S. Oliveira Jr., & A. M. Oliveira Neto (Eds.), *Buva: Fundamentos e Recomendações para Manejo* (1ª ed., pp. 65–90). Curitiba: Omnipax. doi:10.7436/2013.bfrm.0
- Ortiz, J. B., García, M. L. G. de C., & Reiriz, M. C. S. (2003). Histopathological changes induced by lindane (g-hch) in various organs of fishes. *Scientia Marina*, 67(1), 53–61.

- Oruç, E. Ö., & Üner, N. (1999). Effects of 2,4-Diamin on some parameters of protein and carbohydrate metabolisms in the serum, muscle and liver of *Cyprinus carpio*. *Environmental Pollution*, *105*, 267–272.
- Oruç, E. Ö., & Usta, D. (2007). Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential of diazinon in different tissues of *Cyprinus carpio*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *23*(1), 48–55. doi:10.1016/j.etap.2006.06.005
- 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), 1–7. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.08.033
- Paulino, M. G., Souza, N. E. S., & Fernandes, M. N. (2012). Subchronic exposure to atrazine induces biochemical and histopathological changes in the gills of a Neotropical freshwater fish, *Prochilodus lineatus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *80*(1), 6–13. doi:10.1016/j.ecoenv.2012.02.001
- Pereira Maduenho, L., & Martinez, C. B. R. (2008). Acute effects of diflubenzuron on the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology: CBP*, *148*(3), 265–72. doi:10.1016/j.cbpc.2008.06.010
- Pogrmic-Majkic, K., Kaisarevic, S., Fa, S., Dakic, V., Glisic, B., Hrubik, J., & Kovacevic, R. (2012). Atrazine effects on antioxidant status and xenobiotic metabolizing enzymes after oral administration in peripubertal male rat. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *34*(2), 495–501. doi:10.1016/j.etap.2012.06.004
- Pough, F. H., Janis, C. M., & Heiser, J. B. (2008). *A vida dos vertebrados* (p. 684). São Paulo: Atheneu Editora.
- Pretto, A., Loro, V. L., Baldisserotto, B., Pavanato, M. A., Moraes, B. S., Menezes, C., ... Dressler, V. (2011). Effects of water cadmium concentrations on bioaccumulation and various oxidative stress parameters in *Rhamdia quelen*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *60*(2), 309–18. doi:10.1007/s00244-010-9586-2
- Pretto, A., Loro, V. L., Menezes, C., Moraes, B. S., Reimche, G. B., Zanella, R., & De Ávila, L. A. (2011). Commercial formulation containing quinclorac and metsulfuron-methyl herbicides inhibit acetylcholinesterase and induce biochemical alterations in tissues of *Leporinus obtusidens*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *74*(3), 336–41. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.10.003
- Queiroz, G. M. P., Silva, M. R. da, Bianco, R. J. F., Pinheiro, A., & Kaufmann, V. (2011). Transporte De Glifosato Pelo Escoamento Superficial E Por Lixiviação Em Um Solo Agrícola. *Química Nova*, *34*(2), 190–195.
- Rahimi, R., & Abdollahi, M. (2007). A review on the mechanisms involved in hyperglycemia induced by organophosphorus pesticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *88*(2), 115–121. doi:10.1016/j.pestbp.2006.10.003
- Regina, C. C., Olivi, P., R.Botta, C. M., & Espindola, E. L. G. (2008). A Toxicidade Em Ambientes Aquáticos: Discussão E Métodos De Avaliação. *Química Nova*, *31*(7), 1820–1830.
- Reis, R. E., Kullanser, S. O., & Ferraris Jr., C. J. (2003). *Check list of the freshwater fishes of south and Central America*. Porto Alegre: EDIPUCRS.
- Rodrigues, B. N., & Almeida, F. S. (2005). *Guia de Herbicidas* (5^a ed., p. 648pp.). Londrina: IAPAR.
- Roustan, a, Aye, M., De Meo, M., & Di Giorgio, C. (2014). Genotoxicity of mixtures of glyphosate and atrazine and their environmental transformation products before and after photoactivation. *Chemosphere*, *108*, 93–100. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.02.079

- Sahib, I. K. A., Rao, K. R. S. S., & Rao, K. V. R. (1984). Effect of malathion on protein synthetic potentiality of the tissues of the teleost, *Tilapia mostambica* (Peters), as measured through incorporation of (¹⁴C) amino acids. *Toxicology Letters*, *20*(1), 63–67.
- Salaberria, I., Hansen, B. H., Asensio, V., Olsvik, P. a, Andersen, R. a, & Jenssen, B. M. (2009). Effects of atrazine on hepatic metabolism and endocrine homeostasis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicology and Applied Pharmacology*, *234*(1), 98–106. doi:10.1016/j.taap.2008.09.023
- Samanta, P., Pal, S., Mukherjee, A. K., & Ghosh, A. R. (2014). Biochemical effects of glyphosate based herbicide, Excel Mera 71 on enzyme activities of acetylcholinesterase (AChE), lipid peroxidation (LPO), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) and protein content on teleostean fishes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *107*, 120–5. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.05.025
- Sancho, E., Cerón, J. J., & Ferrando, M. D. (2000). Cholinesterase activity and hematological parameters as biomarkers of sublethal molinate exposure in *Anguilla anguilla*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *46*(1), 81–6. doi:10.1006/eesa.1999.1888
- Sancho, E., Ferrando, M. D., & Andreu, E. (1997). Sublethal Effects of an Organophosphate Insecticide on the European Eel, *Anguilla anguilla*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *36*(1), 57–65.
- Sancho, E., Ferrando, M. D., Fernández, C., & Andreu, E. (1998). Liver energy metabolism of *Anguilla anguilla* after exposure to fenitrothion. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *41*(2), 168–75. doi:10.1006/eesa.1998.1689
- Santos, K. C., & Martinez, C. B. R. (2014). Genotoxic and biochemical effects of atrazine and Roundup®, alone and in combination, on the Asian clam *Corbicula fluminea*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *100*, 7–14. doi:10.1016/j.ecoenv.2013.11.014
- Santos, T. G., & Martinez, C. B. R. (2012). Atrazine promotes biochemical changes and DNA damage in a Neotropical fish species. *Chemosphere*, *89*(9), 1118–25. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.05.096
- Sayeed, I., Parvez, S., Pandey, S., Bin-Hafeez, B., Haque, R., & Raisuddin, S. (2003). Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *56*(2), 295–301. doi:10.1016/S0147-6513(03)00009-5
- Sharma, R. M. (1990). Effect of endosulfan on acid and alkaline phosphatase activity in liver, kidney, and muscles of *Channa gachua*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *44*(3), 443–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2328352>
- Shiogiri, N. S., Paulino, M. G., Carraschi, S. P., Baraldi, F. G., da Cruz, C., & Fernandes, M. N. (2012). Acute exposure of a glyphosate-based herbicide affects the gills and liver of the Neotropical fish, *Piaractus mesopotamicus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *34*(2), 388–96. doi:10.1016/j.etap.2012.05.007
- Sies, H. (1993). Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem*, *215*, 213–219.
- Sinhorin, V. D. G., Sinhorin, A. P., Teixeira, J. M. D. S., Miléski, K. M. L., Hansen, P. C., Moreira, P. S. A., ... Loro, V. L. (2014). Effects of the acute exposition to glyphosate-based herbicide on oxidative stress parameters and antioxidant responses in a hybrid Amazon fish surubim (*Pseudoplatystoma* sp). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *106*, 181–7. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.04.040
- Sinhorin, V. D. G., Sinhorin, A. P., Teixeira, J. M. S., Miléski, K. M. L., Hansen, P. C., Moeller, P. R., ... Loro, V. L. (2014). Metabolic and behavior changes in surubim acutely exposed to a glyphosate-based herbicide. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *67*(4), 659–67. doi:10.1007/s00244-014-0073-z

- Soso, A. B., Barcellos, L. J. G., Ranzani-Paiva, M. J., Kreutz, L. C., Quevedo, R. M., Anziliero, D., ... Finco, J. A. (2007). Chronic exposure to sub-lethal concentration of a glyphosate-based herbicide alters hormone profiles and affects reproduction of female Jundiá (*Rhamdia quelen*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 23(3), 308–313. doi:10.1016/j.etap.2006.11.008
- Souza-Bastos, L. R., & Freire, C. A. (2009). The handling of salt by the neotropical cultured freshwater catfish *Rhamdia quelen*. *Aquaculture*, 289(1-2), 167–174. doi:10.1016/j.aquaculture.2009.01.007
- Stanic, B., Andric, N., Zoric, S., Grubor-Lajsic, G., & Kovacevic, R. (2006). Assessing pollution in the Danube River near Novi Sad (Serbia) using several biomarkers in sterlet (*Acipenser ruthenus* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 65(3), 395–402. doi:10.1016/j.ecoenv.2005.08.005
- Storer, T. I., & Usinger, R. L. (2000). *Zoologia Geral* (6th ed., p. 816). São Paulo: Companhia Editora Nacional.
- Stuck, K. C., Stuck, L. M., Overstreet, R. M., & Wang, S. Y. (1996). Relationship between BP (*Baculovirus penaei*) and energy reserves in larval and postlarval Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 24(3), 191–198.
- Tao, Y., Pan, L., Zhang, H., & Tian, S. (2013). Assessment of the toxicity of organochlorine pesticide endosulfan in clams *Ruditapes philippinarum*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 93, 22–30. doi:10.1016/j.ecoenv.2013.03.036
- Thomaz, J. M., Martins, N. D., Monteiro, D. A., Rantin, F. T., & Kalinin, A. L. (2009). Cardio-respiratory function and oxidative stress biomarkers in Nile tilapia exposed to the organophosphate insecticide trichlorfon (Neguvon®). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(5), 1413–1424. doi:10.1016/j.ecoenv.2008.11.003
- Tomlin, C. (1994). *The pesticide manual - incorporating the agrochemicals handbook* (10^a ed., p. 1341p.). Cambridge: British Council.
- Toni, C., Ferreira, D., Kreutz, L. C., Loro, V. L., & Barcellos, L. J. G. (2011). Assessment of oxidative stress and metabolic changes in common carp (*Cyprinus carpio*) acutely exposed to different concentrations of the fungicide tebuconazole. *Chemosphere*, 83(4), 579–584. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.12.022
- Toni, C., Menezes, C., Clasen, B., Leitemperger, J., Pretto, A., Adaime, M. B., ... Lucia Loro, V. (2013). Oxidative stress in carp exposed to quinclorac herbicide under rice field condition. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 92, 27–31. doi:10.1016/j.ecoenv.2013.01.028
- Trenzado, C., Hidalgo, M. C., García-Gallego, M., Morales, A. E., Furné, M., Domezain, A., ... Sanz, A. (2006). Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in sturgeon *Acipenser naccarii* and trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study. *Aquaculture*, 254(1-4), 758–767. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.11.020
- Üner, N., Oruç, E. Ö., Sevgiler, Y., Şahin, N., Durmaz, H., & Usta, D. (2006). Effects of diazinon on acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation in the brain of *Oreochromis niloticus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 21(3), 241–245. doi:10.1016/j.etap.2005.08.007
- Van Handel, E. (1965). Estimation of glycogen in small amounts of tissue. *Analytical Biochemistry*, 11(2), 256–265. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5840660>
- Vidal, R. (1997). *Herbicidas: mecanismos de ação e resistência de plantas* (1^a ed., p. 165). Porto Alegre: Pallotti.
- Xing, H., Li, S., Wang, Z., Gao, X., Xu, S., & Wang, X. (2012). Histopathological changes and antioxidant response in brain and kidney of common carp exposed to atrazine and chlorpyrifos. *Chemosphere*, 88(4), 377–383. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.02.049

- Yeagle, P. L. (1989). Lipid regulation of cell membrane structure and function. *The FASEB Journal*, 3, 1833–1842.
- Zanuto, R., Lorenzetti, F. M., Lima, W. P., & Carnevali Jr., L. C. (2011). *Biologia e Bioquímica: bases aplicadas às ciências da saúde* (p. 304). São Paulo: Phorte.
- Zar, J. H. (2010). *Biostatistical Analysis* (5^a ed., p. 960 p.). Upper Saddle River: Pearson Prentice-Hall.
- 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(2), 167–74. doi:10.1016/j.chemosphere.2003.10.048
- Zhang, X., Yang, F., Zhang, X., Xu, Y., Liao, T., Song, S., & Wang, J. (2008). Induction of hepatic enzymes and oxidative stress in Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*) exposed to waterborne hexabromocyclododecane (HBCDD). *Aquatic Toxicology*, 86(1), 4–11. doi:10.1016/j.aquatox.2007.07.002
- Zocche, J. J., Da Silva, L. A., Damiani, A. P., Mendonça, R. Á., Peres, P. B., Dos Santos, C. E. I., ... Pinho, R. A. (2014). Heavy-metal content and oxidative damage in *Hypsiboas faber*: The impact of coal-mining pollutants on amphibians. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 66(1), 69–77. doi:10.1007/s00244-013-9949-6