



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**EFEITOS DO HERBICIDA GLIFOSATE SOBRE O  
CRESCIMENTO, ENZIMAS DIGESTIVAS E  
PARÂMETROS TOXICOLÓGICOS EM PIAVAS  
(*Leporinus sp.*)**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**JOSEÂNIA SALBEGO**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2005**

**EFEITOS DO HERBICIDA GLIFOSATE SOBRE O  
CRESCIMENTO, ENZIMAS DIGESTIVAS E PARÂMETROS  
TOXICOLÓGICOS EM PIAVAS (*Leporinus sp.*)**

por

**Joseânia Salbego**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós -  
Graduação em Zootecnia, Área de Concentração em Produção Animal,  
Bioquímica de Peixes, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM,  
RS), como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Zootecnia**

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vânia Lúcia Pimentel Vieira**

Santa Maria, RS, Brasil

2005

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Rurais  
Programa de Pós – Graduação em Zootecnia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**EFEITOS DO HERBICIDA GLIFOSATE SOBRE O CRESCIMENTO,  
ENZIMAS DIGESTIVAS E PARÂMETROS TOXICOLÓGICOS EM  
PIAVAS (*Leporinus sp.*)**

elaborada por

**Joseânia Salbego**

Como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Zootecnia**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

**Dra. Vânia L. P. Vieira**  
(Presidente/Orientadora)

---

**Dr. Leonardo José Gil Barcellos , Dr.(UPF)**

---

**Dr. João Radünz Neto, Dr. (UFSM)**

Santa Maria, 26 de agosto de 2005

“Imagina-te no lugar dos companheiros errados, pensa em ti como se fosses a pessoa contra a qual te volta o ressentimento e aprenderás quanto valem a tolerância e o perdão.”

Francisco Cândido Xavier

Pai Claro, Mãe Rosa e  
descendentes da união Pessina  
Salbego, minha família, e Artur  
Giovani: para nós, dedico este  
trabalho, pelo nosso estilo muito  
peculiar de amar e existir.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, a Quem tudo pertence.

À Universidade Federal de Santa Maria, aos Programas de Pós-Graduação em zootecnia (PPGZ) e Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica (PPGBT), pelo espaço e oportunidade para desenvolver este trabalho.

A minha orientadora e mestra, prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vania Lucia Pimentel Vieira, por acreditar na minha capacidade e esforço. Para sempre, meu reconhecimento por sua grandeza!

Aos co-orientadores Prof. Dr. Bernardo Baldisserotto e Prof. Dr. João Radünz Neto, pela sabedoria, orientação, ensinamentos e carisma.

Ao Prof. Dr. José Henrique Sousa da Silva (PPGZ) e à Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Ester Pereira (PPGBT), dignos mestres.

À secretária executiva do PPGZ, Olirta Giuliani, pela eficiência, disposição e amizade.

Ao grupo do Laboratório de Bioquímica Adaptativa, Alexandra, Bibiana, Carolina, Carine, Charlene, Denise, Lissandra, Márcia, Milene, Neiva e Vera: “entre as maiores provações humanas está a convivência” (passagem Bíblica). É uma grande forma de aprender e ensinar!

Aos colegas e amigos da Zootecnia, Rafael Lazzari e Fábio Pedron, pela competência e companheirismo. Vocês fazem parte do êxito deste trabalho.

Para Carol e Leandro, Alexandra e Vera, Milene e Charlene, Neiva e Ronaldo: este trabalho também lhes pertence. Para sempre meu reconhecimento pelo profissionalismo e carisma.

Para meus sobrinhos: Lourenço (esclarecimentos na área de herbicidas) e Matheus (amizade, companhia e dedicação às correções).

Às piavas, parte desta natureza, que contribuem para o progresso da ciência!

## RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Zootecnia

Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

### EFEITOS DO HERBICIDA GLIFOSATE SOBRE O CRESCIMENTO, ENZIMAS DIGESTIVAS E PARÂMETROS TOXICOLÓGICOS EM PIAVAS (*Leporinus sp.*)

Autora: Joseânia Salbego

Orientadora: Vania L.P.Vieira

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 26 de agosto de 2005

Os efeitos do herbicida glifosate (1,0 e 5,0 mg/L) sobre o crescimento, enzimas digestivas e parâmetros toxicológicos foram avaliados em juvenis de piavas (*Leporinus sp.*), após 90 dias de exposição. O grupo controle foi mantido em água sem herbicida. Os peixes foram alimentados até a saciedade aparente, duas vezes ao dia, com ração comercial peletizada (38% de proteína bruta, Purina<sup>®</sup>). A qualidade da água foi mantida através de sifonagem de resíduos de alimento e fezes. A água das caixas foi renovada a cada 48 horas para manter a concentração do glifosate constante durante o período de exposição. Após o período experimental (90 dias), o sangue dos peixes foi rapidamente coletado para determinação dos parâmetros hematológicos. Fígado, músculo branco, cérebro, estômago e intestino foram removidos e utilizados para determinar parâmetros toxicológicos e enzimas digestivas. Depois de 90 dias de exposição, o ganho de peso, taxas de crescimento específico e conversão alimentar diminuíram com o aumento da concentração de glifosate na água. Todas as enzimas digestivas verificadas aumentaram com o aumento da concentração de glifosate. A atividade da acetilcolinesterase (AChE) diminuiu significativamente no cérebro dos peixes expostos a 5 mg/L, e aumentou, no músculo dos peixes expostos a 1mg/L de glifosate. Exposição a este herbicida diminuiu todos os parâmetros hematológicos testados em ambas as concentrações utilizadas, mas redução significativa no glicogênio do fígado e glicose, e aumento no glicogênio muscular, ocorreu apenas em 5 mg/L. A glicose muscular não foi alterada. Lactato dos peixes expostos a todas as concentrações de glifosate, e proteína (5 mg/L) apresentaram um aumento significativo no fígado. Resultados semelhantes, para o lactato, foram encontrados no músculo, mas a proteína diminuiu depois da exposição a 5 mg/L de glifosate. Estes resultados indicam que glifosate afeta

parâmetros de crescimento, hematológicos e metabólicos, bem como enzimas digestivas de piavas. Todos os parâmetros testados podem ser indicadores de contaminação por herbicida depois de exposição prolongada.

## **ABSTRACT**

**Master Dissertation  
Post-Graduate course in Animal Husbandry  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil**

### **EFFECTS OF GLYPHOSATE ON GROWTH, DIGESTIVE ENZYMES AND TOXICOLOGY PARAMETERS IN PIAVAS (*Leporinus sp.*)**

Author: Joseânia Salbego

Adviser: Vania L.P. Vieira

Place and date of defense: Santa Maria, August 26<sup>th</sup>, 2005

The effects of glyphosate (1.0 and 5.0 mg/L) on growth, digestive enzymes and toxicology parameters were evaluated in piavas (*Leporinus sp.*) after 90 days of exposure. A control group was kept in water without herbicide. Fish were fed to satiety twice a day with commercial fish pellets (38% crude protein, Purina®). Water quality was kept by suction of food and fecal residues. The water in the box was renewed every 48 h to maintain herbicide concentration constant during the exposure period. After experimental period (90 days) blood was quickly collected for determining hematological parameters. Liver, white muscle, brain, stomach and intestine were removed and use to determine toxicology parameters and digestive enzymes. After 90 days exposure, fish weight gain, specific growth rate, and feed efficiency were reduced as glyphosate concentration increased in the water. The activity of all digestive enzymes verified increased with the increase of glyphosate concentration. Results indicate that AChE activity significantly decreased in the brain of fish exposed to 5 mg/L of glyphosate, but in the muscle this parameter was increased in the fish exposed to 1mg/L of glyphosate. Exposure to this herbicide produced a decrease in all hematological parameters tested in both concentrations used. Fish exposed to all glyphosate concentrations showed a significant decrease in liver glycogen and glucose, but a significant increase in muscle glycogen after exposure to 5 mg/L herbicide. Muscle glucose was not altered. Lactate and protein (5 mg/L) of fish exposed to all glyphosate concentrations increased in the liver. Similar results were showed in the muscle for lactate, but protein was reduced after exposure to 5 mg/L of glyphosate. These results indicate that glyphosate affect growth, hematologic and metabolic parameters as well digestive enzymes of piavas. All parameters tested may be indicators of herbicide contamination after prolonged exposure.

**Keywords:** glyphosate, growth, digestive enzymes, hematological parameters, toxicology parameters, AChE, piava, *Leporinus sp.*

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	07
<b>ABSTRACT</b> .....	09
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>1.1. Objetivo Geral</b> .....	12
<b>1.2. Objetivos Específicos</b> .....	12
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	13
<b>3. ARTIGO 1</b> .....	18
<b>Abstract</b> .....	19
<b>Introdução</b> .....	20
<b>Materiais e Métodos</b> .....	21
<b>Resultados e Discussão</b> .....	23
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	25
<b>Tabela 1</b> .....	28
<b>Tabela 2</b> .....	28
<b>Tabela 3</b> .....	29
<b>Tabela 4</b> .....	29
<b>4. ARTIGO 2</b> .....	30
<b>Abstract</b> .....	31
<b>Introdução</b> .....	32
<b>Materiais e Métodos</b> .....	33
<b>Resultados e Discussão</b> .....	34
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	36
<b>Tabela 1</b> .....	40
<b>Tabela 2</b> .....	40
<b>Figura 1</b> .....	41
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	42
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	43

# 1. INTRODUÇÃO

O uso de agrotóxicos se expande, em todos os setores da agricultura, pois contribuem para a maior produtividade das lavouras. Entretanto, podem poluir o ambiente na medida em que parte dos resíduos da lavoura podem atingir os cursos hídricos, podendo causar danos aos organismos aí presentes (Sastry and Siddiqui, 1982). A poluição das águas, causada pelo escoamento proveniente de lavouras, onde foram aplicados pesticidas, resulta num sério problema de envenenamento, para peixes e outras formas de vida aquática, além de causar efeitos ambientais a longo prazo (Jyothi and Narayan, 1999). A presença de herbicidas no ambiente aquático é consequência de seu uso para o controle das plantas daninhas e vegetação rasteira, porém, pouco se conhece sobre a toxicidade de herbicidas e pesticidas em organismos aquáticos como os peixes (Szarek et al., 2000). O herbicida glifosate (glyphosate): sal de isopropilamina de N-(fosfonometil) – glicina, é um herbicida registrado no Brasil para o controle não seletivo de mono e dicotiledôneas, em diversas culturas (Rodrigues & Almeida, 1998).

Entre os parâmetros utilizados para avaliar a toxicidade de pesticidas e herbicidas, a medida da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) é muito utilizada (Sancho et al., 2000; Dutta & Arends, 2003). A medida da enzima, associada aos parâmetros hematológicos, pode nos dar uma idéia do estado de saúde dos peixes, e de possíveis efeitos do herbicida.

No Brasil, poucos estudos relacionam o crescimento com a toxicidade de herbicidas, em peixes, principalmente em espécies nativas, como a piava (*Leporinus* sp.). Esta espécie foi escolhida para estudo devido a sua importância econômica e regional, uma vez que, recentemente, foi escolhida como peixe bioindicador das Bacias dos rios Vacacaí e Vacacaí-Mirim. Considerando o exposto acima, serão apresentados os objetivos do presente estudo.

## 1.1. Objetivo Geral:

Verificar os efeitos da exposição prolongada, a doses subletais, do herbicida glifosate, em piavas.

## 1.2. Objetivos Específicos

- Verificar possíveis alterações no crescimento e ganho de peso de piavas, expostas a diferentes concentrações do herbicida;
- Avaliar a atividade de enzimas digestivas, como amilases e proteases, nos peixes expostos ao herbicida.
- Avaliar parâmetros hematológicos e metabólicos, e a atividade da acetilcolinesterase em cérebro e músculo, como indicadores de toxicidade ao herbicida.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

A piava está distribuída na Colômbia, Guianas, Amazônia e rios Araguaia, São Francisco, Paraguai, Paraná, Grande, Pardo, Parnaíba, Tietê, Mogi-Guaçu, da Prata e Uruguai. Popularmente, recebe diferentes denominações, dependendo da região em que se encontra: piau, piavaçu, piaba-uçu, piabaçu e boga (Nomura, 1984; Godoy, 1987). É uma espécie de hábito alimentar onívoro, alimentando-se de vegetais e insetos (principalmente *Chironomidae*), briozoários e restos de peixes (Andrian et al., 1994; Santos, 2000).

Entre as espécies nativas, com potencial para a criação, a piava destaca-se pela presença nas principais bacias hidrográficas da região Sul. Possui também boa aceitação por parte dos consumidores em razão da boa qualidade da carne. Do ponto de vista zootécnico, é praticamente desconhecida, embora existam algumas estações de Piscicultura que estão realizando a multiplicação e venda de alevinos.

Esta espécie é bastante explorada na pesca esportiva e extrativista, que aliada à grande degradação ambiental, tem levado a uma redução do estoque pesqueiro nos rios. Algumas informações encontradas sobre o cultivo da piava, evidenciam a falta de estudos sobre a biologia e principalmente a criação desta espécie (Mello et al., 1999; Filipetto et al., 2003).

O herbicida glifosate está entre os mais utilizados em lavouras, principalmente nas plantações de soja (*Glycine max*). É um herbicida de amplo espectro, com alta eficiência contra 90 tipos de gramas emergidas e ervas daninhas de folha larga (Smith & Oehme, 1992). Serve também para o controle de ervas daninhas aquáticas, em canais e açudes, sendo talvez, um dos mais importantes herbicidas desenvolvidos nestes últimos anos (Rodrigues & Almeida, 1998, Tsui and Chu, 2003). Entre as marcas comerciais mais conhecidas, destaca-se o Roundup®

(Munro et al., 2000; Szarek et al., 2000; Tsui and Chu, 2003), utilizado neste trabalho. No entanto, pouco se conhece sobre os efeitos que águas contaminadas com este produto podem provocar em peixes. O glifosate, de acordo com alguns estudos, não é considerado tóxico para o ambiente, e pouco tóxico para os organismos aquáticos (Giesy et al., 2000). Estudando o Roundup® e seus componentes glifosate, AMPA (ácido aminometilfosfórico) e POEA (polioxietilenoamino), Munro et al. (2000), concluíram que ambos não oferecem risco à saúde humana, exceto quando ingerido em grande quantidade, a fim de suicídio. Já em estudos com Roundup® e POEA, via oral, observaram além de irritação intestinal, efeitos secundários tais como: redução de peso em cães e ratos, diarreia e diminuição de peso no gado bovino. Segundo Tsui e Chu (2003), o POEA, freqüentemente usado na composição deste herbicida, com a finalidade de potencializar sua ação, chega a ser de duas a três vezes mais tóxico que o glifosate. Estudos realizados em carpas, expostas ao herbicida, mostraram alterações hematológicas e histopatológicas degenerativas no fígado e no rim destes animais (Szarek et al., 2000).

As colinesterases são enzimas que desempenham papéis importantes na neurotransmissão colinérgica central e periférica. Elas hidrolisam ésteres de colina e auxiliam na detoxificação de xenobióticos. As colinesterases são amplamente distribuídas tanto em vertebrados como em invertebrados (De La Torre et al., 2002). Herbicidas organofosforados e carbamatos são inibidores potentes da enzima acetilcolinesterase (AChE) (Massoulié et al., 1992). Trabalhos recentes, utilizando a atividade da acetilcolinesterase verificaram que esta enzima pode ser afetada por herbicidas de outras classes (Bretaud and Saglio, 2000; Dutta & Arends, 2003; Miron et al., 2005). Se a atividade da enzima AChE estiver diminuída pela presença de um inibidor, a acetilcolina liberada será acumulada na sinapse colinérgica central e junções neuromusculares, levando a uma super-estimulação das células-alvo. Como consequência, esses distúrbios podem afetar a locomoção e equilíbrio dos organismos expostos (Saglio et al., 1998; Saglio & Trijasse, 1998). Em peixes, vários estudos demonstraram alterações na atividade de colinesterases em águas contaminadas com herbicida (Sancho et al., 2000; Dutta & Arends, 2003).

Associada ao estudo das colinesterases, a medida dos parâmetros hematológicos como hematócrito, hemoglobina, eritrócitos e glóbulos brancos também é considerada importante, pois são indicadores de toxicidade com grande

potencial para aplicação em estudos de impacto ambiental e de toxicidade em animais aquáticos e terrestres (Sancho et al., 2000; Barcellos et al., 2003).

O processo digestório é possibilitado pela ocorrência das enzimas digestivas, atuando sobre o alimento ingerido, ao longo do trato gastro - intestinal (Jobling, 1994). Tem sido verificado que o padrão das enzimas digestivas reflete a capacidade de aproveitamento dos alimentos pelos peixes e também que a indução de determinadas enzimas está diretamente relacionada ao tipo de dieta do peixe (Torrissen et al., 1994). Estudos sugerem que os peixes, de maneira geral, são semelhantes a outros vertebrados, quanto ao processo digestório (Rotta, 2003).

As principais proteases encontradas no trato digestório são: pepsina, tripsina e quimotripsina. O estômago da maioria dos peixes produz enzimas proteolíticas, sendo que a mais comum é a pepsina, que inicia todo o processo de hidrólise das proteínas, é produzida no estômago e dependente da redução do pH, feita pelo ácido clorídrico (Baldisserotto, 2003). O pH pode variar no trato digestório de acordo com o tipo de enzima que atua na degradação do alimento (Deguara et al., 2003). Avaliando a atividade das enzimas proteolíticas da tainha *Mugil platanus*, na fase de larva e alevino, Galvão et al. (1997) observaram que a ingestão de alimento induz o aumento na atividade enzimática. Na fase larval deste peixe ocorre uma digestão alcalina, sendo que enzimas como a pepsina e quimotripsina atuam mais na fase de juvenil, ocorrendo uma digestão ácida.

A atividade das enzimas digestivas está diretamente relacionada com a composição da dieta (Ray, 1988; De Silva & Anderson, 1995). Peixes não-carnívoros, como a carpa comum (*Cyprinus carpio*), apresentam alto potencial proteolítico (Hidalgo et al., 1999). Isso é devido à digestão das proteínas vegetais, e, embora os onívoros precisem relativamente menos proteína que os carnívoros, elas podem ser bem utilizadas, o que induz o aumento na atividade das enzimas proteolíticas (Kuz`mina, 1990).

A maioria dos trabalhos sobre digestão, em peixes, relatam que as proteínas possuem um papel importante no processo digestório, e em geral estes organismos dão preferência ao aproveitamento das proteínas em relação aos carboidratos (Hemre et al., 2002). Estudando diferentes espécies, com hábitos alimentares variados, Hofer and Schiemer (1981), verificaram que a atividade proteolítica (tripsina), é maior em carnívoros que em herbívoros, não havendo diferenças claras entre carnívoros e onívoros. No entanto, a atividade proteolítica foi significativamente maior em piscívoros que na espécie onívora *Rasbora daniconius*.

Estudos realizados no laboratório de Bioquímica Adaptativa, da UFSM, observaram a presença de amilase e maltase em grande quantidade, no intestino das piavas (Gioda et al., 2005). A elevada atividade da amilase em peixes herbívoros e onívoros indica que o amido é facilmente hidrolisado e provavelmente desempenha um importante papel no metabolismo energético destes peixes. Já sua presença em carnívoros, pode ser explicada pelas necessidades destes animais em digerir o glicogênio do tecido de suas presas (Sabapathy & Teo, 1992). Segundo Seixas Filho et al. (1999), a atividade específica da amilase no surubim (*Pseudoplatystoma coruscans*), carnívoro, é maior do que na piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), onívora. Utilizando juvenis de *Sparus aurata*, Venou et al. (2003) verificaram que a extrusão de ingredientes vegetais proporciona maior atividade da amilase, interferindo positivamente no aproveitamento dos carboidratos, para esta espécie. A tripsina hidrolisa o tripsinogênio e quimotripsinogênio em tripsina e quimotripsina, respectivamente, atuando nas ligações peptídicas que envolvem os grupos carboxila da arginina e lisina, enquanto a quimotripsina age, como a pepsina, principalmente nas ligações envolvendo aminoácidos aromáticos (Smith, 1989). Estudando a atividade de proteases, em três espécies de peixes, López et al. (1999), observaram que dietas de origem vegetal, como farelo de soja, podem inibir a atividade de proteases digestivas nestes animais.

Estudando a atividade enzimática da tripsina em piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) e piau (*Leporinus friderici*), espécies onívoras, e surubim (*Pseudoplatystoma coruscans*), espécie carnívora, Seixas Filho et al. (2000), concluíram que a atividade da tripsina foi semelhante nas duas últimas espécies, sugerindo que o surubim utiliza, com mais intensidade, outras proteases na digestão de proteínas. Analisando a atividade e distribuição das enzimas digestivas, em função do hábito alimentar no "rabbitfish" (*Siganus canaliculatus*), herbívoro com potencial para onívoro e no "sea bass" (*Lates calcarifer*), carnívoro, Sabapathy & Teo (1992), relataram a presença de tripsina ao longo do tubo digestivo, na espécie onívora. Nestes peixes, a atividade da tripsina e quimotripsina foi elevada. Já na espécie carnívora, a atividade da pepsina foi mais elevada, enquanto que a tripsina ficou restrita ao intestino e cecos pilóricos. Nessas duas espécies, também foi observada a capacidade de digestão de carboidratos. A composição da dieta pode influenciar a liberação e atividade das enzimas digestivas. Onishi et al. (1976), comparando a frequência da administração do alimento, em carpas, relataram

mudanças nos níveis de protease e amilase após alimentação. O efeito da dieta na atividade das enzimas digestivas também foi encontrado em larvas de *Dicentrarchus labrax*, em um experimento executado por Cahu and Zambonino Infante (1994).

Considerando-se que os peixes vivem em constante risco de contaminação por componentes tóxicos em geral, e a espécie em estudo apresenta poucos dados referentes a sua biologia, torna-se importante conhecer possíveis alterações causadas por herbicidas. A composição corpórea dos peixes pode apresentar diferenças, influenciadas por diversos fatores, entre eles os ambientais (Geri et al., 1995; Shirai et al., 2002). O estudo visa contribuir para o entendimento da toxicidade do herbicida glifosate em uma espécie nativa do Brasil.

### 3. ARTIGO 1

**Glifosate afeta crescimento e enzimas digestivas em piavas (*Leporinus* sp.)**

Joseânia Salbego<sup>1</sup>, Alexandra Pretto<sup>1</sup>, Carolina Rosa Gioda<sup>1</sup>, \*Vania L. P. Vieira<sup>1</sup>,  
Rafael Lazzari<sup>2</sup>, João Radünz Neto<sup>2</sup>

Departamentos de Química (1) e Zootecnia (2), Universidade Federal de Santa  
Maria – Avenida Roraima, Camobi, Santa Maria, RS, Brasil - 97105.900

Autor para Correspondência:

(\*)Dr<sup>a</sup>. Vania Lucia Pimentel Vieira

Departamento de Química

Universidade Federal de Santa Maria

97105.900 - Santa Maria, RS, Brasil

55-55 –3220-9456

Fax: 55-55 - 3220-8240

e-mail: [vanial@smail.ufsm.br](mailto:vanial@smail.ufsm.br)

[vaniluc@yahoo.com.br](mailto:vaniluc@yahoo.com.br)

**Obs.** Artigo em fase de preparação para ser submetido à publicação na Revista  
Ciência Rural.

## **Abstract**

The effects of glyphosate (1.0 and 5.0 mg/L) on growth, digestive enzymes and toxicology parameters was evaluated in young (8g and 9 cm approximately) piavas (*Leporinus* sp.) after 90 days of exposure. A control group was kept in water without herbicide. Fish were fed to satiety twice a day with commercial fish pellets (38% crude protein, Purina<sup>®</sup>). Water quality was kept by suction of food residues and fecal residues. The water in the box was renewed every 48 h to maintain herbicide concentration constant during the exposure period. After 30, 60 and 90 days 15 fish was collected randomly to verify fish weight and length. Stomach and intestine were removed and use to determine digestive enzymes. After 30, 60 and 90 days of exposure, fish weight gain, specific growth rate, fed efficiency were reduced as glyphosate concentration increased in the water. The activity of all digestive enzymes verified increased with the increase of glyphosate concentration. These results indicate that glyphosate affect growth and digestive enzyme activities in piavas. Parameters tested may be indicators of poor nutrient availability when fish survive in herbicide contaminated water.

**Keywords:** glyphosate, growth, digestives enzymes, piava, *Leporinus* sp.

## Introdução

O uso de agrotóxicos se expande, em todos os setores da agricultura, pois contribuem para a maior produtividade das lavouras. Entretanto, podem poluir o ambiente na medida em que parte dos resíduos da lavoura podem atingir os cursos hídricos, podendo causar danos aos organismos aí presentes (Sastry and Siddiqui, 1982). A poluição das águas, causada pelo escoamento proveniente de lavouras, onde foram aplicados pesticidas, resulta num sério problema de envenenamento, para peixes e outras formas de vida aquática, além de causar efeitos ambientais a longo prazo (Jyothi and Narayan, 1999). A presença de herbicidas no ambiente aquático é consequência de seu uso para o controle das plantas daninhas e vegetação rasteira, porém, pouco se conhece sobre a toxicidade de herbicidas e pesticidas em organismos aquáticos como os peixes (Szarek et al., 2000).

Entre os agrotóxicos usados em larga escala, atualmente, está o glifosate (glyphosate). É um herbicida quimicamente conhecido como sal de isopropilamina de N-(fosfonometil)-glicina (Rodrigues & Almeida, 1998). Recebe diferentes denominações comerciais (Giesy, 2000), sendo que a mais conhecida, mundialmente, é o Roundup® (Munro et al., 2000; Szarek et al., 2000; Tsui and Chu, 2003), o qual foi utilizado para o presente trabalho.

Popularmente, é conhecido por secante, pois inibe a fotossíntese, a síntese dos ácidos nucléicos e estimula a produção de etileno, provocando o amarelecimento das folhas e posterior morte das plantas. Resíduos químicos podem se acumular em organismos aquáticos por diversos mecanismos: diretamente da água via brânquias, pela pele, pela ingestão de partículas suspensas e alimentos contaminados (Oost et al., 2003). Pesticidas podem atacar o sistema nervoso, causando desordens fisiológicas e bioquímicas, e a exposição crônica à concentrações subletais de xenobióticos, são suspeitas de predispor os peixes à doenças, devido a seus efeitos imunodepressivos (Dunier and Siwicki, 1993; Jyothi and Narayan, 1999; Miron et al., 2005). Segundo Jyothi and Narayan (1999), alterações biológicas causadas por estresse toxicológico, podem ser notadas analisando-se alterações no metabolismo, tais como atividades enzimáticas e suas modificações, e respostas fisiológicas.

Com relação à interação crescimento e enzimas digestivas, a maioria dos estudos indica que a taxa máxima de crescimento, em peixes, pode ser atribuída, em parte, à capacidade digestiva (atividade de enzimas proteolíticas), disponibilidade de oxigênio ou à capacidade metabólica requerida para suportar a síntese de proteínas nos tecidos (Torrissen and Shearer, 1992; Blier et al., 2002;).

Alterações na atividade de enzimas digestivas podem estar relacionadas, ou não, à taxa de crescimento. Torrissen and Shearer (1992) recolheram evidências de que a atividade da tripsina tem uma forte influência sobre a taxa de crescimento e conversão alimentar em salmão do Atlântico (*Salmo salar* L.), entretanto, não se pode afirmar se a variação observada, nas enzimas digestivas, é causa ou consequência das mudanças no crescimento.

Pouco se sabe sobre a toxicidade de herbicidas em peixes. De uma maneira geral, o herbicida glifosate é considerado de baixa toxicidade (Munro et al., 2000), porém, para peixes nativos do Brasil, como a piava, não existem estudos relacionando a interação de herbicidas com o crescimento, e seus efeitos sobre a atividade de enzimas digestivas.

Considerando-se a importância do assunto e a escassez de trabalhos relacionados, no presente estudo buscou-se verificar possíveis alterações no crescimento e ganho em peso, e avaliar a atividade de enzimas digestivas, como amilases e proteases, em piavas expostas a diferentes concentrações deste herbicida.

## **Materiais e Métodos**

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Bioquímica Adaptativa do Departamento de Química, da Universidade Federal de Santa Maria. O experimento teve duração de 90 dias, compreendidos entre os meses de setembro e dezembro de 2004. Foram utilizados 180 juvenis de piavas, com peso inicial aproximado de 8 gramas e comprimento de 9 cm. Até a fase juvenil, os peixes foram criados em um tanque de terra com área de 1000 metros quadrados, no setor de Piscicultura do Departamento de Zootecnia, da mesma instituição.

Antes do início do experimento, os animais ficaram em tanques de polipropileno, para adaptação, sendo submetidos durante 10 dias a um tratamento profilático com cloreto de sódio (4 g/L de água). Decorrido o período de adaptação, os peixes foram transferidos para tanques de amianto, com pintura

impermeabilizante, volume de 250 L, e submetidos a duas concentrações de glifosate diluído em água: 1,0 mg/L e 5,0 mg/L, mais tratamento controle (0,0mg/L). As concentrações, utilizadas para os testes de exposição prolongada, foram escolhidas levando-se em conta as utilizadas nas lavouras (0,36 – 2,16 mg/L), de acordo com Rodrigues & Almeida (1998). Uma concentração entre este intervalo e uma acima da utilizada.

Foi preparada uma solução-mãe (estoque) com concentração 5000mg/L, calculada a partir da concentração comercializada (48% pura = 480.000 mg de glifosate por litro), para reposição do herbicida nos tanques. Cada tratamento foi constituído por dois tanques, contendo 30 peixes em cada um, em um sistema fechado com água termorregulada (cada tanque continha uma resistência elétrica e um termostato acoplados, com a finalidade de manter a temperatura da água em 25°C) e aeração constante. Os animais foram alimentados duas vezes ao dia (10h e 16h) até a saciedade aparente, com ração comercial com 38% de proteína bruta, extrusada (Purina®). A ração restante foi pesada a cada final de semana nos mesmos dias e horários, para estimar a quantidade de ração consumida em cada tratamento.

O controle da qualidade da água foi realizado através de sifonagem dos resíduos (fezes) de cada tanque, de dois em dois dias (ou conforme necessidades decorridas de alterações). A água sifonada era repostada na mesma quantidade. Nos tratamentos que continham inclusão de glifosate, a reposição incluía a diluição da solução-mãe (estoque), para manter as concentrações do produto, em cada tratamento. Foram analisadas as seguintes características físico-químicas da água: temperatura (25 °C), pH (7,4), oxigênio dissolvido (7,2), amônia total (0,007 mg/L) e nitrito (0,003 mg/L), diariamente. Dureza (30 mg/L de CaCO<sub>3</sub>) e alcalinidade (35 mg/L de CaCO<sub>3</sub>), semanalmente. Para a aferição da temperatura e oxigênio dissolvido utilizou-se oxímetro YSI (modelo Y5512). Para pH, pHmetro Digimed. Os valores de amônia total foram verificados através do reagente de Nessler, segundo Jeffery et al. (1992), os valores de nitrito, alcalinidade e dureza através dos métodos descritos em Sipaúba-Tavares (1994). A água utilizada para a realização das análises foi sempre coletada antes da sifonagem. O abastecimento dos tanques foi de poço artesiano, sendo que a água era previamente aerada (no mínimo 24 h) antes da utilização.

Realizaram-se biometrias no início e a cada 30 dias, onde eram coletados 15 peixes, aleatoriamente, por unidade experimental. Os peixes foram pesados com

balança digital e medidos com ictiômetro graduado. Após as biometrias, os animais eram devolvidos para os tanques. Os parâmetros estimados foram: comprimento total e padrão, peso médio individual, taxa de crescimento específico, biomassa total, ganho de peso, fator de condição e consumo diário de ração, em percentagem de peso vivo individual, de acordo com Jobling (1994).

Decorrido o período experimental, 15 animais foram aleatoriamente capturados e sacrificados através do desligamento da medula espinhal com o cérebro. Realizou-se a coleta dos tecidos (intestino e estômago), os quais foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido, para posterior análise das enzimas. O conteúdo digestivo foi descartado e os respectivos órgãos homogeneizados com solução tampão Tris pH 7,0, utilizando-se homogenizador potter-elvehjem a 1000 x g durante 2 minutos e centrifugado a 1500 x g / 20 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram utilizados como fonte enzimática, para avaliar a atividade da amilase, protease ácida, tripsina e quimotripsina.

A atividade das enzimas digestivas foi estimada conforme a seguir: amilase, segundo o método proposto por Bernfeld (1955); protease ácida, de acordo com metodologia proposta por Hidalgo et al. (1999); tripsina e quimotripsina, segundo metodologias descritas em Hummel (1959). Todas as metodologias enzimáticas foram modificadas e estão descritas em Vieira et al. (2005).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), com 3 tratamentos e 2 repetições. Os dados obtidos foram submetidos a testes de normalidade, após foram analisados através de análise de variância e teste "F". As médias obtidas, quando houveram diferenças significativas, foram comparadas através de análise de regressão. Todas as análises estatísticas realizadas tiveram um nível mínimo de significância de 5%. Ao serem detectadas variáveis com distribuição não-normal, os dados sofreram transformações para que fossem normalizados. Para a realização das análises estatísticas utilizou-se o pacote estatístico SAS (1997).

## **Resultados e Discussão**

Na Tabela 1, encontram-se os dados de crescimento dos alevinos de piava aos 30 dias de exposição. Verificou-se que para todos os parâmetros avaliados, exceto fator de condição e consumo de ração em relação ao peso vivo, houve efeito linear decrescente em relação aos níveis de 1 e 5 mg/L de glifosate, na água de criação.

Cabe ressaltar que o consumo de alimento não foi afetado pelo glifosate, porém, houve grande redução no ganho em peso nos peixes expostos.

Aos 60 dias de experimento (Tabela 2) houve redução significativa no peso dos animais. No entanto, para comprimento padrão e total não houve efeito significativo entre os tratamentos testados. Em relação aos 30 dias de experimento, o consumo foi inferior neste período, e também não houve efeito significativo entre os níveis de glifosate testados. No final do experimento (90 dias), verificou-se redução significativa para a maioria dos parâmetros de crescimento, nos tratamentos com inclusão de glifosate, conforme demonstra a Tabela 3. No tratamento com 5mg/L de glifosate, verificou-se os menores valores para comprimento total e padrão, peso médio, taxa de crescimento específico, biomassa total e ganho em peso.

Quanto à atividade das enzimas digestivas, pode-se observar na Tabela 4, que houve um aumento gradativo, à medida que a inclusão do herbicida, na água de criação, foi maior. O aumento na atividade das enzimas digestivas pode significar uma tentativa do organismo de aumentar o aproveitamento do alimento, compensando outras possíveis perdas, causadas pela intoxicação. Alterações no crescimento e peso sugerem que a busca pela manutenção do organismo, sob a ação do herbicida, requer uma demanda de energia maior, nesta situação. Por outro lado, as reduções observadas no peso, indicam que a presença do herbicida, na água, interfere no processo de crescimento, mas estas alterações não podem ser atribuídas às enzimas digestivas avaliadas, uma vez que ocorre aumento nestas atividades. Blier et al. (2002) sugerem que o crescimento pode ser determinado por vários fatores, entre eles: a atividade de enzimas digestivas, a disponibilidade de oxigênio para o metabolismo dos tecidos e a síntese de proteínas. Neste estudo, os nutrientes oriundos da digestão foram disponibilizados, porém, tiveram seu aproveitamento comprometido provavelmente pela ação do herbicida, uma vez que no grupo controle não ocorreu interferência no crescimento. Os herbicidas e pesticidas em geral podem interferir na disponibilidade de oxigênio para os tecidos, como mostram outros estudos (Oruç and Uner, 1999; Gimeno et al., 1995; Begum, 2004). Alterações metabólicas também podem interferir no processo de crescimento. Neste estudo podemos atribuir a redução no crescimento a um somatório de fatores como: pouco aproveitamento dos nutrientes disponíveis, redução do oxigênio nos tecidos, com conseqüente redução da taxa metabólica.

Analisando-se os resultados obtidos pode-se concluir que o herbicida glifosate interfere no crescimento de piavas, e, mesmo concentrações baixas, como as

utilizadas nas lavouras, podem causar danos a estes peixes. Embora a atividade das enzimas digestivas tenha sido aumentada, nos grupos tratados com herbicida, o aproveitamento dos nutrientes parece comprometido, uma vez que houve redução de crescimento. Os parâmetros testados podem ser indicadores de efeitos tóxicos nestes peixes quando sobrevivem em águas contaminadas com glifosate.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem ao CNPQ pelo auxílio financeiro ao desenvolvimento do trabalho (processo número 475017/03-0).

### **Referências Bibliográficas**

BEGUM, G. Carbofuran insecticide induced biochemical alterations in liver and muscle tissues of the fish *Clarias batrachus* (linn) and recovery response. **Aquatic Toxicology**, v. 66, p. 83-92, 2004.

BERNFELD, P. **Amylases  $\alpha$  e  $\beta$ : colorimetric assay methods**. In: Colowick, S.P. Kaplan, N. O. **Methods in enzymology**. New York: Academic Press. v.1, 149 pp., 1955.

BLIER, P.U., et al. Is the growth of fish set by digestive enzymes or metabolic capacity of the tissues? Insight from transgenic coho salmon. **Aquaculture**, v. 209, p.379-384, 2002.

DUNIER, M. and SIWICKI, A. K. Effects of pesticides and other organic pollutants the aquatic environment on immunity of fish: a review. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 3, p. 423-438, 1993.

GIESY, J.P., DOBSON, S., SOLOMON, K.R., Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide. **Rev. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 167, p. 35-120, 2000.

GIMENO, L. et al. Pesticide effects on eel metabolism. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 31, p.153 –157, 1995.

HIDALGO, M. C.; UREA, E.; SANZ, A. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. **Aquaculture**, v. 170, p. 267-283, 1999.

HUMMEL, B. C. W. A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin and thrombin. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 1393-1399, 1959.

JEFFERY, G.H. et al. **Análise química quantitativa**. Rio de Janeiro: Guanabara Kogan, 1992.

JYOTHI, B. and NARAYAN, G. Certain pesticide-induced carbohydrate metabolic disorders in the serum of freshwater fish *Clarias batrachus* (Linn.). **Food and Chemical Toxicology**, v.37, p. 417-421, 1999.

JOBLING, M. **Fish bioenergetics**, London. Chapman & Hall, 1994. 309 pp.

MIRON, D.S. et al. Effects of the herbicides clomazone, quinclorac and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.61, p. 398-403, 2005.

MUNRO, I.C. et al. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.31, p. 117-165, 2000.

OOST, R. van der.; BEYER, J.;VERMAULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.13, p. 57-149, 2003.

ORUÇ, E.Ö. and ÜNER, N. Effects of 2,4-Diamin on some parameters of protein and carbohydrate metabolisms in the serum, muscle and liver of *Cyprinus carpio*. **Environ. Pollut.**, v. 105, p. 267-272, 1999.

RODRIGUES, B.N. & ALMEIDA, F.S. de. **Guia de Herbicidas**. Londrina. 4 ed., 1998. p. 300-313.

SAS - **STATISTICAL ANALISIS SYSTEM. USER'S GUIDE VERSION 6.08**; SAS INSTITUTE INC. North Caroline. 4 ed. 846 p.1997.

SASTRY, K. V. and SIDDIQUI, A. A. Chronic toxic effects of the carbamate pesticide sevin on carbohydrate metabolism in a freshwater snakehead fish, *Channa punctatus*. **Toxicology Letters**, v. 14, p. 123-130, 1982.

SIPAUBA – TAVARES, L.H. **Limnologia aplicada a aquicultura**. Boletim técnico 1. FUNEP : Jaboticabal, 1994.120 pp.

SZAREK, J. et al. Effects of the herbicide Roundup on the ultrastructural pattern of hepatocytes in carp (*Cyprinus carpio*). **Marine Environmental Research**, v. 50, p.263-266, 2000.

TORRINSEM, K.R. and SHEARER, K.D. Protein digestion, growth and food conversion in Atlantic salmon and Arctic charr with different trypsin-like isozyme patterns. **J. fish Biol.**, v. 41, p. 409-415, 1992.

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

VIEIRA, V.L.P., INOUE, L.A.K., MORAES, G. Metabolic response of matrinxã (*Brycon cephalus*) to dietary protein level. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 140, p. 337-342. 2005.

**Tabela 1.** Parâmetros de crescimento de alevinos de piava, expostos por 30 dias, a diferentes níveis de glifosate, na água de criação.

Variável	Glifosate (mg/L)				
	0	1	5	CV	P
Comprimento total (cm) <sup>1</sup>	11,45	9,93	9,79	6,48	0,0427
Comprimento padrão (cm) <sup>2</sup>	9,48	8,30	7,77	4,23	0,0114
Peso médio (g) <sup>3</sup>	16,72	11,01	9,39	17,07	0,0356
Taxa de crescimento específico <sup>4</sup>	2,16	0,70	0,11	22,45	0,0264
Biomassa total (g) <sup>5</sup>	1003	660,4	563,4	17,01	0,0348
Ganho em peso (g/dia) <sup>6</sup>	0,27	0,07	0,02	31,56	0,0362
Fator de condição	1,15	1,11	0,98	14,43	0,2512
Consumo diário (%peso/dia)	4,55	4,91	5,42	3,34	0,2634

<sup>1</sup> Efeito linear:  $Y=10,89-0,2470X$  ( $r^2=0,65$ ).

<sup>2</sup> Efeito linear:  $Y=9,08-0,2833X$  ( $r^2=0,86$ ).

<sup>3</sup> Efeito linear:  $Y=14,69-1,1622X$  ( $r^2=0,77$ ).

<sup>4</sup> Efeito linear:  $Y=1,66-0,3362X$  ( $r^2=0,75$ ).

<sup>5</sup> Efeito linear:  $Y=881,70-69,7321X$  ( $r^2=0,77$ ).

<sup>6</sup> Efeito linear:  $Y=0,20-0,0395X$  ( $r^2=0,78$ ).

Onde y = variável dependente; X= variável independente.

**Tabela 2.** Parâmetros de crescimento de alevinos de piava, expostos por 60 dias, a diferentes níveis de glifosate, na água de criação.

Variável	Glifosate (mg/L)				
	0	1	5	CV	P
Comprimento total (cm)	12,05	11,42	10,88	7,41	0,1830
Comprimento padrão (cm)	9,90	9,23	9,13	8,70	0,3827
Peso médio (g) <sup>1</sup>	20,39	16,92	14,86	10,76	0,0129
Taxa de crescimento específico <sup>2</sup>	1,42	1,06	0,86	16,80	0,0127
Biomassa total (g) <sup>3</sup>	1223,60	1014,90	891,50	10,55	0,0129
Ganho em peso (g/dia) <sup>4</sup>	0,20	0,13	0,10	22,12	0,0135
Fator de condição	1,17	1,25	1,15	29,06	0,8717
Consumo diário (%peso/dia)	2,19	2,38	2,48	4,68	0,3548

<sup>1</sup> Efeito linear:  $Y=19,26-0,9376X$  ( $r^2=0,78$ ).

<sup>2</sup> Efeito linear:  $Y=1,31-0,0960X$  ( $r^2=0,78$ ).

<sup>3</sup> Efeito linear:  $Y=1155,85-56,2571X$  ( $r^2=0,78$ ).

<sup>4</sup> Efeito linear:  $Y=0,17-0,0160X$  ( $r^2=0,79$ ).

Onde y = variável dependente; X= variável independente.

**Tabela 3.** Parâmetros de crescimento de alevinos de piava, expostos por 90 dias, a diferentes níveis de glifosate, na água de criação.

Variável	Glifosate (mg/L)				
	0	1	5	CV	P
Comprimento total (cm) <sup>1</sup>	13,37	11,98	11,70	6,30	0,0333
Comprimento padrão (cm) <sup>2</sup>	11,05	9,77	9,62	6,20	0,0093
Peso médio (g) <sup>3</sup>	25,27	18,15	16,10	10,31	0,0036
Taxa de crescimento específico <sup>4</sup>	1,18	0,79	0,66	12,33	0,0026
Biomassa total (g) <sup>5</sup>	1515,9	1088,8	966,2	10,31	0,0036
Ganho em peso (g/dia) <sup>6</sup>	0,18	0,10	0,08	18,57	0,0032
Fator de condição	1,06	1,05	1,01	7,10	0,6926
Consumo diário (%peso/dia)	2,19	2,38	2,48	4,68	0,3548

<sup>1</sup> Efeito linear:  $Y=12,87-0,2583X$  ( $r^2=0,40$ ).

<sup>2</sup> Efeito linear:  $Y=10,58-0,2154X$  ( $r^2=0,41$ ).

<sup>3</sup> Efeito linear:  $Y=22,75-1,4547X$  ( $r^2=0,85$ ).

<sup>4</sup> Efeito linear:  $Y=1,04-0,0832X$  ( $r^2=0,86$ ).

<sup>5</sup> Efeito linear:  $Y=1364,87-87,2857X$  ( $r^2=0,85$ ).

<sup>6</sup> Efeito linear:  $Y=0,16-0,0164X$  ( $r^2=0,85$ ).

Onde y = variável dependente; X= variável independente.

**Tabela 4.** Enzimas digestivas em estômago e intestino de piavas, após 90 dias de exposição, a : 0 (sem herbicida), 1 e 5 mg/L, de glifosate. Os valores estão expressos com média  $\pm$  erro padrão da média. Letras diferentes na linha indicam diferença significativa em relação ao grupo controle ( $P < 0,05$ ) ( $n=8$ ).

Enzimas (U/mg proteína)	Glifosate (mg/L)		
	0	1	5
Amilase estômago	0,91 <sup>b</sup> $\pm$ 0,11	1,36 <sup>b</sup> $\pm$ 0,17	1,97 <sup>a</sup> $\pm$ 0,13
Amilase intestino	2,26 <sup>b</sup> $\pm$ 0,11	4,09 <sup>a</sup> $\pm$ 0,02	4,28 <sup>a</sup> $\pm$ 0,02
Protease ácida	7,47 <sup>c</sup> $\pm$ 0,25	25,42 <sup>b</sup> $\pm$ 1,21	30,74 <sup>a</sup> $\pm$ 1,45
Tripsina	1,70 <sup>b</sup> $\pm$ 0,04	2,26 <sup>a</sup> $\pm$ 0,12	2,38 <sup>a</sup> $\pm$ 0,08
Quimotripsina	48,75 <sup>c</sup> $\pm$ 2,56	144,21 <sup>a</sup> $\pm$ 6,81	107,48 <sup>b</sup> $\pm$ 4,89

As enzimas estão expressas em: U/mg de proteína, onde U =  $\mu$ mol de amido hidrolisado por min para amilase U =  $\mu$ g de tirosina/min para protease ácida, e U = quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1  $\mu$ g de substrato (TAME ou BTEE) para tripsina e quimotripsina respectivamente.

## 4. ARTIGO 2

**Herbicida glifosate e a atividade da acetilcolinesterase, parâmetros hematológicos e metabólicos em piavas (*Leporinus* sp)**

Joseânia Salbego<sup>1</sup>, Milene Braga da Fonseca<sup>1</sup>, Leandro Lissner<sup>1</sup>, \*Vania Lucia Pimentel Vieira<sup>1</sup>, Neiva Braun<sup>2</sup>, Bernardo Baldisserotto<sup>2</sup>

Departamentos de Química (1) e Fisiologia (2), Universidade Federal de Santa Maria – Avenida Roraima, Camobi, Santa Maria, RS, Brasil - 97105.900

Autor para Correspondência:

(\*)Dr<sup>a</sup>. Vania Lucia Pimentel Vieira

Departamento de Química

Universidade Federal de Santa Maria

97105.900 - Santa Maria, RS, Brasil

55 -55- 3220-9456

Fax: 55 -55-3220-8240

e-mail: [vanial@smail.ufsm.br](mailto:vanial@smail.ufsm.br)

[vaniluc@yahoo.com.br](mailto:vaniluc@yahoo.com.br)

Obs.: artigo em fase de preparação para ser submetido á publicação na Revista **Environmental Research**.

## Abstract

The effects of glyphosate (1.0 and 5.0 mg/L) on toxicology, hematologic and metabolic parameters of piavas were evaluated in piavas (*Leporinus* sp.) after 90 days of exposure. A control group was kept in water without herbicide. Fish were fed to satiety twice a day with commercial fish pellets (38% crude protein, Purina®). Water quality was kept by suction of food residues and fecal residues. The water in the box was renewed every 48 h to maintain herbicide concentration constant during the exposure period. After experimental period (90 days) fish blood was quickly collected for determining hematological parameters. Liver, brain and white muscle were removed and used to determine toxicology parameters. Results indicate that acetylcholinesterase (AChE) activity significantly decreased in the brain of fish exposed to 5 mg/L of glyphosate, but in the white muscle this parameter increased. Exposure to this herbicide produced a decrease in all hematological parameters tested in both concentrations used. Fish exposed to all glyphosate concentrations showed a significant decrease in liver glycogen and glucose, but a significant increase in muscle glycogen after exposure to 5 mg/L herbicide. Muscle glucose was not altered. Lactate and protein (5 mg/L) of fish exposed to all glyphosate concentrations increased in the liver. Similar results were shown in the muscle for lactate, but protein was reduced after exposure to 5 mg/L of glyphosate. These results indicate that glyphosate affects AChE activity, hematologic and metabolic parameters of piavas. All parameters tested may be indicators of herbicide contamination after prolonged exposure.

**Keywords:** glyphosate, growth, hematological parameters, toxicology parameters, piava, *Leporinus* sp.

## Introdução

A contaminação de águas de superfície causada pelo uso de herbicidas e pesticidas, nas atividades agrícolas, é um problema de importância mundial, devido aos riscos de contaminação oriundos desta prática (Oruç and Üner, 1999). O herbicida comercial glifosate (48%), recebe diferentes denominações comerciais (Giesy et al., 2000), sendo o Roundup®, o mais popular (Munro et al., 2000; Szarek et al., 2000; Tsui and Chu, 2003), e que foi utilizado para o presente trabalho. Este herbicida contém um ingrediente ativo o qual é um equivalente ácido do sal de isopropilamina N-fosfometil glicina, sendo considerado um herbicida pós-emergente e não seletivo usado para o controle de plantas aquáticas (Abdullah et al., 1995; Jiraungkoorskul et al., 2002).

As concentrações de glifosate utilizadas nas culturas de arroz (*Oryza sativa*) e soja (*Glycine max*) na região Sul do Brasil variam de 0,36 até 2,16 mg/L. A solubilidade, em água, deste herbicida é de 15.700 mg/L, e sua meia vida no solo varia de 30 à 90 dias (Rodrigues & Almeida, 1998). Informações sobre as características tóxicas deste herbicida, dos componentes utilizados em sua fórmula, bem como seus efeitos em peixes e organismos aquáticos, são escassos. De acordo com Giesy et al. (2000) o glifosate não se acumula em animais terrestres e aquáticos, sendo largamente utilizado ao redor do mundo devido a sua alta eficiência, baixo custo, e também por ser considerado não tóxico e facilmente degradado no meio ambiente. Estudos de toxicidade conduzidos em roedores, cães, coelhos, invertebrados aquáticos e peixes mostraram que o herbicida é altamente tóxico para as plantas e relativamente pouco tóxico para outros animais incluindo peixes (Williams et al., 2000). Peixes teleósteos podem ser bons indicadores de contaminação por poluentes devido as suas respostas bioquímicas serem muito similares às obtidas em mamíferos. A resposta de alguns peixes aos poluentes foi bem estudada através da medida de parâmetros hematológicos e fisiológicos (Gimeno et al., 1995; Sancho et al., 1998; Begum, 2004).

A piava (*Leporinus* sp.) foi escolhida para este estudo por ser uma espécie nativa da Região Sul do Brasil, com bom potencial para o cultivo e aceitação pelo mercado consumidor (Andrian et al., 1994). A medida da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), presente nas sinapses colinérgicas e nervos motores, é

bem utilizada por diferentes autores como um biomarcador para monitorar os efeitos de carbamatos e organofosforados em peixes (Chuiko, 2000; De La Torre et al., 2002; Fernández-Vega et al., 2002). A atividade da AChE é muito importante para muitas funções nos peixes, como: deslocamento em direção a presa, escape de predador e orientação em direção ao alimento. Quando a atividade da AChE diminui, a acetilcolina excedente da sinapse não é hidrolisada e acumula-se na fenda sináptica, causando uma disfunção na transmissão sináptica (Dutta and Arends, 2003). Os objetivos do presente estudo foram investigar os efeitos de exposição prolongada ao herbicida glifosate sobre a atividade da acetilcolinestrerase, parâmetros metabólicos e hematológicos em piavas, como possíveis indicadores de toxicidade por herbicidas.

## **Materiais e Métodos**

Piavas de ambos os sexos foram obtidas no setor de piscicultura da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS, Brasil). Os peixes (8g e 9cm), foram aclimatados às condições do laboratório durante 10 dias. Eles foram mantidos em tanques de 250L com aeração e temperatura controladas. Durante o período experimental (setembro a dezembro de 2004), os parâmetros de qualidade de água, monitorados, foram os seguintes: temperatura  $25 \pm 0,5$  °C, pH  $7,0 \pm 0,05$ , oxigênio  $7,2 \pm 0,2$  mg/L. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia (10 e 16 h) com ração comercial (38% de proteína bruta, Purina®). Resíduos de ração e fezes foram removidos a cada 2 dias, ou diariamente se necessário. Experimentos preliminares não encontraram o valor da CL<sub>50</sub> para o glifosate, pois todos os peixes sobreviveram até a concentração de 100 mg/L, demonstrando comportamento de alimentação e natação normais. As concentrações utilizadas, para os testes de exposição prolongada, foram escolhidas levando-se em conta as utilizadas nas lavouras (0,36-2,16 mg/L), uma concentração entre este intervalo e uma acima da utilizada.

Após o período de aclimação, grupos de 30 peixes foram distribuídos em tanques de 250 L e expostos durante 90 dias aos seguintes tratamentos: controle (0,0 de glifosate), 1,0 e 5,0 mg/L de glifosate. Os tratamentos foram feitos em duplicata. O herbicida foi adicionado à água no início do experimento, derivado de uma solução estoque, previamente preparada, com concentração 5.000 mg/L, calculada a partir da concentração comercializada (48% pura = 480.000 mg de glifosate por litro). Os parâmetros de qualidade de água obtidos durante o período

de aclimatação foram mantidos durante o experimento. No final do período de exposição (90 dias), 15 peixes foram amostrados, e o sangue coletado rapidamente na veia caudal com seringa heparinizada. O sangue total foi utilizado para determinação de parâmetros hematológicos de acordo com Barcellos et al. (2004). A seguir, os animais foram sacrificados através do desligamento da medula espinhal com o cérebro. Os tecidos (cérebro, fígado e músculo) foram removidos, congelados em nitrogênio líquido e estocados a -20°C. O glicogênio do fígado e músculo foi determinado de acordo com Bidinotto et al. (1997). A proteína dos tecidos foi estimada de acordo com Lowry et al. (1951). Amostras de tecido foram homogeneizadas com ácido tricloroacético 10% usando um homogenizador de teflon e depois centrifugadas a 1000 x g por 10 minutos. O sobrenadante desproteínizado foi utilizado para determinação de lactato, conforme Harrower e Brown (1972) e açúcares redutores (Park and Johnson, 1949). Os parâmetros avaliados foram padronizados para esta espécie no laboratório de Bioquímica Adaptativa. A atividade da acetilcolinesterase AChE (EC 3.1.1.7) foi ensaiada conforme descrito por Ellman et al. (1961) e modificado por Miron et al., (2005). A proteína foi determinada de acordo com Bradford (1976). Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e, para F significativo, foi feito o pós-teste de Tukey. As médias foram consideradas significativas a um nível de 5% ( $P < 0,05$ ).

## **Resultados e Discussão**

A atividade da AChE no cérebro dos peixes expostos a 5 mg/L de glifosate reduziu em 25% quando comparada ao grupo controle. Entretanto, exposição ao glifosate, nesta mesma concentração, não causa alterações significativas no músculo, mas, ocorre aumento da atividade da AChE (50%) em peixes expostos a 1 mg/L (figura. 1). Inibição da AChE em cérebro foi também observada em enguias (*Anguilla anguilla*) expostas ao diazinon (0,042 mg/L inibição de 75%) (Cerón et al., 1996), e *Lepomis macrochirus* exposto ao endosulfan (0,001 mg/L - 96 h, inibição de 16 %) (Dutta and Arends, 2003). Considerando que foram utilizadas concentrações maiores que as dos estudos mostrados, comparativamente, a formulação do glifosate utilizada no presente estudo parece ser menos tóxica para a AChE de cérebro que o diazinon e o endosulfan. A atividade da enzima AChE é muito utilizada em peixes como um indicador de toxicidade por herbicidas e pesticidas. Esta enzima é muito importante para a função colinérgica, entre outras, nos peixes.

Quando a atividade da AChE diminui, como neste estudo, a acetilcolina (ACh) não é quebrada e acumula-se dentro da fenda sináptica, causando desordens como distúrbios no movimento, e alterações no comportamento de natação. Estas alterações já foram bem descritas em outras espécies de peixes expostos ao herbicida atrazina (Saglio and Trijasse, 1998) e diuron (Bretaud et al., 2000). A redução da AChE em cérebro, observada em nosso estudo pode ser em parte devido ao diluente utilizado na fórmula do glifosate, mais do que ao glifosate diretamente. De acordo com Giesy et al. (2000) a CL<sub>50</sub> (mg/L) para truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) está entre: 8,2 - 27 para Roundup<sup>®</sup>, entre 0,65 – 7,4 para o POEA (polioxietilenoamino) e entre 140 - 240 para o glifosate puro, mostrando que o POEA, utilizado na formulação dos herbicidas à base de glifosate, como o Roundup<sup>®</sup>, é o componente mais tóxico.

O fígado, que pode ser considerado o centro de detoxificação do organismo, reage primeiro após estresse causado por agentes tóxicos (Sancho et al., 1998). Neste estudo, piavas expostas ao glifosate mostraram redução significativa no glicogênio hepático em todas as concentrações testadas, e redução na glicose na concentração de 5 mg/L quando comparadas aos valores controle (tabela 1). Aumento significativo na proteína (5 mg/L) e lactato, em todas concentrações testadas, também foi observado (tabela 1). O tecido muscular aumentou o glicogênio na concentração 5 mg/L enquanto a glicose não alterou significativamente em ambas concentrações testadas. Os níveis de proteína muscular diminuíram na concentração de 5 mg/L, enquanto o lactato aumentou significativamente em ambas concentrações testadas (tabela 1). A redução no glicogênio hepático observada neste estudo pode indicar que o estresse causado pelo herbicida é seguido de uma depleção do glicogênio hepático. A elevação do lactato também indica desordens metabólicas e uma resposta fermentativa à redução do glicogênio. Sancho et al. (1998) observaram a mesma resposta quando enguias foram expostas ao fenitrothion. Redução de glicogênio hepático e muscular, depois de estresse causado por herbicidas e pesticidas, já foi bem documentado por vários autores (Ghosh, 1987; Shobba et al., 1989; Sancho et al., 1998; de Aguiar et al., 2004). Entretanto, o padrão da resposta parece ser bem específico para cada espécie de peixe. Glicogênio de músculo mostrou-se reduzido em *Clarias batrachus* exposto ao organofosforado rogor (Begum and Vijayaraghavan, 1999), mas mudanças não foram observadas nos estoques de glicogênio hepático de *Anguilla anguilla* expostas ao fenitrothion (1/10 CL<sub>50</sub>) (Sancho et al., 1997).

A redução da proteína muscular pode ser uma resposta à demanda de energia requerida nesta situação, de exposição prolongada ao glifosate. A alta demanda energética leva à estimulação do catabolismo proteico em outras espécies de peixes (Sancho et al., 1998; Begum, 2004). Redução de conteúdo protéico, no plasma e tecidos, já foi bem documentado por outros autores como uma hipoproteinemia generalizada, em peixes, após exposição a tóxicos (Sancho et al., 2000). Os valores controle dos parâmetros hematológicos medidos no presente estudo (Tabela 2), são similares aqueles observados por Sancho et al. (2000) em *A. anguilla* expostas ao pesticida molinato. Os efeitos observados em piavas incluem redução nos valores de hematócrito, hemoglobina e contagem de eritrócitos, e podem refletir um princípio de anemia nestes peixes. Uma condição de anemia geralmente pode ser indicada pela redução no hematócrito, hemoglobina e perda de proteína plasmática (Sancho et al., 2000). De acordo com Barcellos et al. (2003), a condição anêmica é determinada pela redução no conteúdo de hemoglobina. Estudos de Antón et al. (1994), também mostraram efeitos da toxicidade do glifosate para peixes. O presente estudo revela que a exposição de piavas ao glifosate produz uma redução na atividade da AChE em cérebro e em alguns parâmetros hematológicos. As respostas obtidas podem ser utilizadas como bons indicadores de toxicidade pelo glifosate nos tecidos de piavas em exposição prolongada.

## Referências Bibliográficas

- Abdullah, M.P., Daud, J., Hong, K.S., Yew, C.H., 1995. Improved method for the determination of glyphosate in water. **J. Chromatogr. A** 697, 363-369.
- Andrian, I. de F., Dória, C. da C., Torrente, G., Ferreti, C.M.L., 1994. Espectro alimentar e similaridade na composição de quatro espécies de *Leporinus* (Characiformes, Anostomidae) do Rio Paraná, Brasil. **Revista Unimar** 16 (suplemento3): 97-106.
- Antón, F.A., Laborda, E., Ariz, M., 1994. Acute toxicity of the herbicide glyphosate to fish. **Chemosphere** 28, 745-753.
- Barcellos, L.J.G., Kreutz, L.C., Rodrigues, L.B., Fioreze I., Quevedo R.M., Cericato L., Conrad J., Soso A.B., Fagundes M., Lacerda, L. A. & Terra, S., 2003. Haematological and biochemical characteristics of male jundiá (*Rhamdia*

*Quelen*, Quoy & Gaimard, Pimelodidae): changes after acute stress. **Aquaculture Research**. 34, 1565-1469.

- Barcellos, L.J.G., Kreutz, L.C., Quevedo, R.M., Fioreze, I., Cericato, L., Soso, A.B., Fagundes, M., Conrad, J., Baldissera, R.K., Bruschi, A., Ritter, F., 2004. Nursery rearing of jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard) in cages: cage type, stocking density and stress response to confinement. **Aquaculture**. 232, 383-394.
- Begum, G. and Vijayaraghavan, S., 1999. Effect of acute exposure of the organophosphate insecticide Rogor on some biochemical aspects of *Clarias batrachus* (Linnaeus). **Environ. Res.** 80, 80-83.
- Begum, G., 2004. Carbofuran insecticide induced biochemical alterations in liver and muscle tissues of the fish *Clarias batrachus* (Linn) and recovery response. **Aquat. Toxicol.** 66, 83-92.
- Bidinotto, P.M., Souza, R.H.S., Moraes, G., 1997. Hepatic glycogen and glucose in eight tropical freshwater teleost fish: a procedure for field determinations of micro samples. **Bol. Tec. CEPTA**. Pirassununga 10, 53-60.
- Bradford, M.M.A., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72, 248-254.
- Brethead S., Toutant J.P., Saglio P., 2000. Effects of carbofuran, diuron and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*). **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 47, 117-124.
- Cerón, J.J., Ferrando, M.D., Sancho, E., Gutierrez-Panizo, C., Andreu-Moliner E., 1996. Effects of diazinon exposure on cholinesterase activity in different tissues of European eel (*Anguilla anguilla*). **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 35, 222-225.
- Chuiko, G.M., 2000. Comparative study of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in brain and serum of several freshwater fish: specific activities and in vitro inhibition by DDVP, an organophosphorus pesticide. **Comp. Biochem. Physiol. C** 127, 233-242.
- De Aguiar, L.H., Moraes, G., Avilez, I.M., Altran, A.E., Corrêa, C.F., 2004. Metabolical effects of folidol 600 on the neotropical freshwater fish matrinxã, *Brycon cephalus*. **Environ. Res.** 95, 224-230.

- De La Torre, F.R., Ferrari, L., Salibián, A., 2002. Freshwater pollution biomarker: response of brain acetylcholinesterase activity in two fish species. **Comp. Biochem. Physiol. C** 131, 271-280.
- Dutta, H.M., Arends, D.A., 2003. Effects of endosulfan on brain acetylcholinesterase activity in juvenile bluegill sunfish. **Environ. Res.** 91, 157-162.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, Jr. V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmacol.** 7, 88-95.
- Fernández-Vega, C., Sancho, E., Ferrando, M.D., Andreu, E., 2002. Thiobencarb-induced changes in acetylcholinesterase activity of the fish *Anguilla anguilla*. **Pest. Biochem. Physiol.** 72, 55-63.
- Ghosh, T.K., 1987. Impact of grade hexagor and sumidon on behavior and some aspects of carbohydrate metabolism in fish *Cyprinus carpio*. **J. Zool.** 7, 48-62.
- Giesy, J.P., Dobson, S., Solomon, K.R., 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide. **Ver. Environ. Contam. Toxicol.** 167: 35-120.
- Gimeno, L., Ferrando, M.D., Sanchez, S., Gimeno, L.O., Andreu, E., 1995. Pesticide effects on eel metabolism. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 31, 153 -157.
- Harrower, J.R., Brown, C.H., 1972. Blood lactic acid. A micromethod adapted to field collection of microliter samples. **J. Appl. Physiol.** 32, 709-711.
- Jiraungkoorskul, W., Upatham, E.S., Kruatrachue, M., Sahaphong S., Vichasri-Grams, S., Pokethitiyook, P., 2002. Histopathological effects of Roundup, a glyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Science Asia.** 28, 121-127.
- Lowry, D.H., Rosenbrough, N.J., Far, A.L., Randal, R.J., 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193, 265-275.
- Miron, D.S., et al., 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, 398-403.
- Munro, I.C. et al., 2000. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. **Regulatory Toxicology and Pharmacology.** 31, 117-165.
- 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*. **Environ. Pollut.** 105, 267-272.

- Park, J.T., Johnson, M.J., 1949. A submicro determination of glucose. **J. Biol. Chem.** 181,149-151.
- Rodrigues, B.N. & Almeida, F.S., 1998. **Guia de Herbicidas**. Londrina: Paraná-Brasil, 648pp.
- Saglio, P., Trijasse, S., 1998. Behavioral responses to atrazine and diuron in goldfish. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** 35, 484-491.
- Sancho, E., Ferrando, M.D., Andreu, E., 1997. Sublethal effects of an organophosphate insecticide on the European eel, *Anguilla anguilla*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 36, 57-65.
- Sancho, E., Ferrando, M.D., Fernández, C. and Andreu, E., 1998. Liver energy metabolism of *Anguilla anguilla* after exposure to fenitrothion. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 41, 168-175.
- Sancho, E., Cerón, J.J., Ferrando, M.D., 2000. Cholinesterase activity and hematological parameters as biomarkers of sublethal molinate exposure in *Anguilla anguilla*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 46, 81-86.
- Shobha, R.J.V., Venkateswarlu, P.V., Janaiah, C., 1989. Changes in carbohydrate metabolism of *Clarias batrachus* (Linn.) when exposed to two organophosphorus insecticides. **J. Environ. Biol.** 10, 197-204.
- Szarek, J.; Siwicki, A.; Andrzejewska, A.; Terech-Majewska, E.; Banaszkiwicz, T., 2000. Effects of the herbicide Roundup on the ultrastructural pattern of hepatocytes in carp (*Cyprinus carpio*). **Marine Environmental Research.** 50, 263-266.
- Tsui, M.T.K., Chu, L.M., 2003. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. **Chemosphere.** 52, 1189 -1197, 2003.
- Williams, G.M., Kroes, R., Munro, I.C., 2000. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. **Regulat. Toxicol. Pharmacol.** 31, 117-165.

**Tabela 1.** Metabólitos em fígado e músculo de piavas expostas a diferentes níveis de glifosate, na água de criação, durante 90 dias.

Metabólitos	Glifosate (mg/L)		
	0	1	5
<b>Fígado</b>			
Glicogênio	5,75 <sup>a</sup> ±0,33	3,37 <sup>b</sup> ± 0,08	3,68 <sup>b</sup> ± 0,12
Glicose	36,7 <sup>a</sup> ±0,82	36,25 <sup>a</sup> ±1,61	30,75 <sup>b</sup> ±1,53
Lactato	7,08 <sup>b</sup> ±0,08	13,76 <sup>a</sup> ±0,62	12,52 <sup>a</sup> ±0,35
Proteína	165 <sup>b</sup> ±5,32	151,2 <sup>b</sup> ±3,21	199,5 <sup>a</sup> ±6,15
<b>Músculo</b>			
Glicogênio	2,21 <sup>b</sup> ±0,05	2,22 <sup>b</sup> ± 0,06	2,55 <sup>a</sup> ± 0,08
Glicose	0,39 <sup>a</sup> ±0,06	0,41 <sup>a</sup> ±0,01	0,46 <sup>a</sup> ±0,03
Lactato	22,9 <sup>c</sup> ±0,86	35,3 <sup>b</sup> ±1,22	52,9 <sup>a</sup> ±0,70
Proteína	141 <sup>a</sup> ±3,40	135 <sup>ab</sup> ±4,10	128 <sup>b</sup> ±1,42

Os dados representam a média ± desvio padrão. Glicogênio, glicose e lactato foram expressos em µmol/g de tecido e proteína em mg/g de tecido. Letras diferentes na linha, indicam diferença, entre os tratamentos, pelo teste de Duncan (P<0,05), (n=8).

**Tabela 2.** Parâmetros hematológicos de piavas após exposição a diferentes níveis de glifosate, na água de criação, por 90 dias.

Parâmetros	Glifosate (mg/L)		
	0	1	5
Hematócrito (%)	26,3 ± 2,02	23,6 ± 0,50*	24,0±0,44*
Hemoglobina (g/dL)	10,2 ±0,46	8,78 ± 0,32*	8,31 ± 0,55*
Eritrócitos (x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	1,97 ±0,04	1,70 ±0,02*	1,75 ±0,06*
Leucócitos (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	127,5 ±1,30	125,5 ± 3,31	124 ±1,13

Dados representam a média ± desvio padrão, (n=8). \* na linha indica diferença em relação ao grupo controle ( 0 mg/L) (P<0,05).

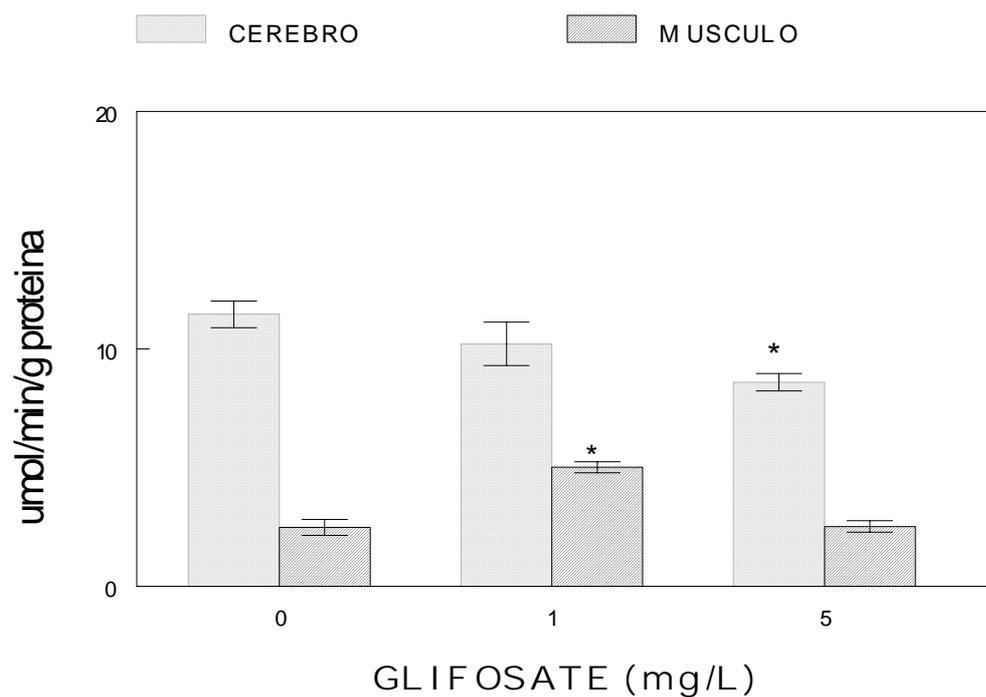


Figura 1. Atividade da acetilcolinesterase em cérebro e músculo de piavas expostas a diferentes níveis de glifosate, por 90 dias. Os valores representam a média  $\pm$  erro-padrão (n=8).\* indica diferença significativa em relação ao grupo controle (0 mg/L) ( $P < 0,05$ ).

## 5. CONCLUSÕES

- \* As alterações na atividade da acetilcolinesterase e intermediários metabólicos, indicam mecanismos de acomodação dos animais à sobrevivência, em água de criação, com o herbicida glifosate.
- \* A redução nos parâmetros hematócrito e hemoglobina, indicam um princípio de anemia. No caso da redução da hemoglobina, os tecidos tiveram menos disponibilidade de oxigênio.
- \* O aumento na atividade das enzimas digestivas evidencia uma tentativa do organismo de aumentar o aproveitamento do alimento, compensando outras possíveis perdas causadas pela intoxicação.
- \* As alterações no crescimento e peso mostram que, quando em águas contaminadas com o herbicida glifosate, e em exposição prolongada, estes peixes apresentam redução no crescimento.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRIAN, I.F. et al. Espectro alimentar e similaridade na composição da dieta de quatro espécies de *Leporinus* (CHARACIFORMES, ANATOMIDAE) do Rio Paraná, Brasil. **Revista Unimar**. v.16, p.97-107, 1994.

BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à Piscicultura**. Santa Maria: Ed. UFSM, 212 pp., 2003.

BARCELLOS, L.J.G. et al. Haematological and biochemical characteristics of male jundiá (*Rhamdia Quelen*, Quoy & Gaimard, Pimelodidae): changes after acute stress. **Aquaculture Research**. v. 34, p.1565-1469, 2003.

BRETAUD, S., TOTANT, J.P and SAGLIO, P. Effects of carbofuron, Diuron and nicossulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 47, p.117-124, 2000.

CAHU, C.L. and ZAMBONINO INFANTE, J.L.Z. Influence of diet on pepsin and some pancreatic enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. Great Britain, **Comp. Biochem. Physiol. Part A**. v. 109 , n.2, p. 209-212, 1994.

DEGUARA, S.; JEUNCEY, K.; AGLUS, C. Enzyme activities and pH variations in the digestive tract of gilthead sea bream. **Journal of Fish Biology**. v. 62, n.5, p. 1033-1043, 2003.

DE LA TORRE, F.R, FERRARI, L., SALIBIAN, A. Freshwater pollution biomarker: response of brain acetylcholinesterase activity in two fish species. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**. v. 131, p. 271-280, 2002.

DUTTA , H.M. & ARENDS, D.A. Effects of endosulfan on brain acetylcholinesterase activity in juvenile bluegill sunfish. **Environmental Research**.v. 91, p. 157-162, 2003.

DE SILVA, S. S. & ANDERSON, T. A. **Fish Nutrition in Aquaculture**. Ed. Chapman & Hall, 1995.

FILIPETTO, J.E.S. *et al.* Substituição de fígado bovino por glúten de trigo no crescimento de pós-larvas de piava (*Leporinus* sp.). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 1, p. 192-197, jan-fev, 2005.

GALVÃO, M.S.N. *et al.* Estudos preliminares sobre enzimas proteolíticas da tainha *Mugil platanus* (Osteichthyes, Mugilidae) durante as fases larval e juvenil. **Boletim do Instituto de Pesca**. v. 24, p. 101-110, 1997.

GERI, G. *et al.* Body traits and chemical composition of muscle in the common carp (*Cyprinus carpio* L.) as influenced by age and rearing environment. **Aquaculture**. v. 129, p. 329-333, 1995.

GIODA, C.R. *et al.* Digestive enzyme activity in freshwater fishes with different feeding habits. **Aquaculture Nutrition**, in press, 2005.

GIESY, J.P., DOBSON, S., SOLOMON, K.R. Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide. **Rev. Environ. Contam. Toxicol.** v. 167, p. 35-120, 2000.

GODOY, M.P. **Peixes do Estado de Santa Catarina**. Florianópolis: UFSC, v. 1, 571 pp., 1987.

HEMRE, G.; MOMMSEM, T.; KROGDAHL, A. Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. **Aquaculture Nutrition**. v. 8, n. 3, p. 175-194, 2002.

HIDALGO, M. C.; UREA, E.; SANZ, A. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. **Aquaculture**. v. 170, p. 267-283, 1999.

HOFER, R. and SCHIEMER, F. Proteolytic activity in the digestive tract of several species of fish with different feeding habits. **Oecologia**. v. 48, p. 342-345, 1981.

JOBLING, M.. **Fish bioenergetics**. London: Chapman & Hall, 309 pp., 1994.

JYOTHI, B. and NARAYAN, G. Certain pesticide-induced carbohydrate metabolic disorders in the serum of freshwater fish *Clarias batrachus* (Linn.). **Food and Chemical Toxicology**. v. 37, p. 417- 421, 1999.

KUZ`MINA, V. Temperature influence on the total level of proteolytic activity in the digestive tract of some species of freshwater fishes. **J. Ichthyol.** v. 30, p. 97-109, 1990.

LÓPEZ, M. F. J. et al. Meal inhibition of digestive proteases by vegetable in three fish species; seabream (*Sparus aurata*), tilapia (*Oreochromis niloticus*) and African sole (*Solea senegalensis*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**. v. 122, p. 327-332, 1999.

MASSOULIE, J. et al. Molecular and cellular biology of cholinesterases. **Progress in Neurobiology**. v. 41, p. 31- 41, 1992.

MELLO, R.F. et al. Suplementação da dieta de alevinos de piauí (*Leporinus obtusidens*) com vitamina C. **Scientia Agrícola**, v. 56, n.4, p. 1223-1231, 1999.

MIRON, D.S. et al. Effects of the herbicides clomazone, quinclorac and metsulfuronmethyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 61, p. 398-403, 2005.

MUNRO, I.C. et al. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. v. 31, p. 117-165, 2000.

NOMURA, H. **Dicionário dos peixes do Brasil**. Brasília: Editerra, v.1, 482 pp., 1984.

ONISHI,T., MURAYAMA,S., TAKEUCHI,M. Changes in digestive enzyme levels in carp after feeding – III response of protease and amylase to twice-a-day feeding. **Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.** v. 42, p. 921-923, 1976.

RAY, A. K. On the digestive enzymes in three Indian freshwater perches in relation to food and feeding habits. **Journal Inland Fishery Society Índia.** v. 20, n.1, p. 1-5, 1988.

RODRIGUES, B.N. & ALMEIDA, F.S. de. **Guia de Herbicidas.** Londrina. 4 ed. p. 300-313, 1998.

ROTTA, M.A. Aspectos gerais da fisiologia e estrutura do sistema digestivo dos peixes relacionados à piscicultura. **Embrapa, Centro de Pesquisa do Pantanal,** Corumbá, documento n.º 53, 2003.

SABAPATHY, U. & TEO, L. H. A quantitative study of some digestive enzymes in the rabbitfish, *Siganus canaliculatus* and the sea bass, *Lates calcarifer*. **British isles. J. Fish Biol.** v. 42, p. 595-602, 1992.

SAGLIO, P., OLSEN, K.H., BERTAUD, S. Behavior and olfactory responses to prochloraz, bentazone, and nicosulfuron contaminated flows in goldfish. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** v.35, p. 4-491, 1998.

SAGLIO, P., & TRIJASSE, S. Behavioral responses to atrazine and diuron in goldfish. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** v. 35, p. 484-491, 1998.

SANCHO, E. et al. Alterations on AChE activity of the fish *anguilla anguilla* as response to herbicide-contaminated water. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** v. 46, 57-63. 2000.

SANTOS, G.O. Aspectos biológicos importantes para a piscicultura do gênero *Leporinus* Sapes, 1829- uma revisão. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha,** v. 6, n.1, p. 151-156, 2000.

SASTRY, K. V. and SIDDIQUI, A. A. Chronic toxic effects of the carbamate pesticide sevin on carbohydrate metabolism in a freshwater snakehead fish, *Channa punctatus*. **Toxicology Letters**. v. 14, p. 123-130, 1982.

SEIXAS FILHO, J. T.; OLIVEIRA, M. G. A.; DONZELE, J. L.; et al. Atividade de amilase em quimo de três espécies tropicais de peixe Teleostei de água doce. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 28, n. 5, p. 907-913, 1999.

SEIXAS FILHO, J.T.; OLIVEIRA, M.G.A.; DONZELE, J.L. et al. Atividade da tripsina em quimo de três espécies neotropicals de peixes Teleostei de água doce. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.6, p.6-14, 2000 (suplemento 2).

SMITH, L.B. **Digestive functions in the teleost fishes**. In: **Fish Nutrition**, 2nd ed (Halver, J.E.,ed) . New York: Academic Press, p. 331- 421, 1989.

SMITH, E.A. & OEHME, F.W. The biological activity of glyphosate to plants and animals: a literature review. **Veterinary and Human Toxicology**. v. 34, p.531-543,1992.

SHIRAI, N. et al. Dietary and seasonal effects on the dorsal meat lipid composition of Japanese (*Silurus asotus*) and Thai catfish (*Clarias macrocephalus*) and hybrid *Clarias macrocephalus* and *Clarias galipinus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**. v. 132, p. 609-619, 2002.

SZAREK, J. et al. Effects of the herbicide Roundup on the ultrastructural pattern of hepatocytes in carp ( *Cyprinus carpio* ). **Marine Environmental Research**. v. 50, p.263-266, 2000.

TORRISSEN, K. R.; LIED, E.; ESPE, M. Differences in digestion and absorption of dietary protein in Atlantic Salmom (*Salmo salar*) with genetically different trypsin isozymes. **Journal of Fish Biology**. v. 45(6), p. 1087-1104, 1994.

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

VENOU, B. et al. Effect of extrusion of wheat and corn on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) growth, nutrient utilization efficiency, rates of gastric evacuation and digestive enzymes activities. **Aquaculture**. v. 225, p. 207-223, 2003.