



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**PARÂMETROS TOXICOLÓGICOS EM PIAVAS (*Leporinus obtusidens*) E JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*) APÓS EXPOSIÇÃO A UMA FORMULAÇÃO COMERCIAL DE GLYPHOSATE**

**TESE DE DOUTORADO**

**Lissandra Gluszczak**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2008**

**PARÂMETROS TOXICOLÓGICOS EM PIAVAS (*Leporinus obtusidens*) E JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*) APÓS EXPOSIÇÃO A UMA FORMULAÇÃO COMERCIAL DE GLYPHOSATE**

por

**Lissandra Gluszczak**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Área de Concentração em Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Bioquímica Toxicológica.**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vania Lucia Loro

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2008**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Naturais e Exatas  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:  
Bioquímica Toxicológica**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Tese de Doutorado

**PARÂMETROS TOXICOLÓGICOS EM PIAVAS (*Leporinus  
obtusidens*) E JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*) APÓS EXPOSIÇÃO A  
UMA FORMULAÇÃO COMERCIAL DE GLYPHOSATÉ**

elaborada por

**Lissandra Gluszczak**

como requisito parcial para a obtenção do grau de  
**Doutor em Bioquímica Toxicológica**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vania Lucia Loro**  
(Presidente/Orientadora)

---

**Prof. Dr. Juliano Ferreira (UFSM)**

---

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

---

**Prof. Dr. Luis Antonio de Avila (UFSM)**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Rosa Chitolina Schetinger (UFSM)**

Santa Maria, 15 de fevereiro de 2008.

***Lute pelos seus ideais, sonhos e desejos,  
pois Deus está dentro de você e esta é a  
maior força que existe!***

## **DEDICATÓRIA**

**Aos meus admiráveis e incansáveis pais Nicolau e Neide, pelo amor incondicional e por sempre incentivar-me a lutar e a persistir para a concretização dos meus ideais.**

**A minha irmãzinha e grande amiga Letícia, agradeço de todo coração o amor, companheirismo, cumplicidade, incentivo, carinho e compreensão nos momentos alegres e tristes desta caminhada.**

**Ao meu grande amor Eduardo, muito obrigada pela paciência, companheirismo, dedicação, amor e compreensão, pois ao teu lado pude entender melhor o sentido da vida e aprendi que a felicidade depende de nós mesmos.**

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela minha existência e por ter permitido mais esta conquista.

À minha família, que é a “base” da minha vida.

Aos meus avós Feliciano (*in memorian*) e Josefa, pelo amor, carinho e afeto dedicados, apesar da distância.

À professora orientadora Vania Lucia Loro, pela oportunidade, eficiência, incentivo e confiança depositada durante estes anos de orientação.

Às queridas amigas Bibiana e Alice, muito obrigada pela amizade, carinho, cumplicidade, companheirismo e colaboração.

A todas colegas e amigas do laboratório de Bioquímica Adaptativa: Bibiana, Alice, Alexandra, Charlene, Rita, Milene, Róli, Bárbara, Roberta, Denise e Aracéli, pela troca de experiências, colaboração científica, convivência, companheirismo e amizade que certamente continuará por toda nossa existência.

Aos professores Juliano Ferreira, Leonardo José Gil Barcellos, Luis Antonio de Avila e Maria Rosa Chitolina Schetinger pela disponibilidade de ler esta tese e de compor sua comissão examinadora.

À UFSM e aos professores do Curso de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, pela luta incessante para a qualificação profissional de seus alunos.

Aos funcionários do PPGBTOX, especialmente a Angélica e a Márcia, pelo dinamismo, competência e disponibilidade em nos ajudar sempre.

Às piavas e aos jundiás, “peças-chave” para a concretização desta tese.

A CAPES pelo auxílio financeiro.

Aos amigos e colegas, não citados nominalmente, cujo apoio e palavras de incentivo não me deixaram desanimar frente às inúmeras dificuldades enfrentadas, as quais serviram de estímulo para seguir em frente.

## RESUMO

Tese de Doutorado  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

### **Parâmetros toxicológicos em piavas (*Leporinus obtusidens*) e jundiás (*Rhamdia quelen*) após exposição a uma formulação comercial de glyphosate**

AUTORA: LISSANDRA GLUSCZAK

ORIENTADORA: VANIA LUCIA LORO

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 15 de fevereiro de 2008

As formulações comerciais do herbicida glyphosate têm sido amplamente utilizadas na agricultura e na piscicultura para controle de plantas daninhas. Os peixes podem ser afetados quando as águas de drenagem atingem os cursos d'água, acarretando um desequilíbrio no ecossistema aquático. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de uma formulação comercial de glyphosate sobre parâmetros toxicológicos em piavas (*Leporinus obtusidens*) e jundiás (*Rhamdia quelen*). Piavas foram expostas à: 0 (controle), 3, 6, 10 ou 20 mg/L de glyphosate (480 g/L) e os jundiás à 0 (controle), 0,2 ou 0,4 mg/L, ambos por 96 h. Os parâmetros analisados foram enzimáticos (AChE), hematológicos (hematócrito, hemoglobina, contagem de eritrócitos e de leucócitos) e metabólicos (glicose, glicogênio, lactato, proteína e amônia) em diferentes tecidos destas espécies. Ademais, analisaram-se parâmetros de estresse oxidativo, como a atividade da enzima antioxidante catalase, carbonilação de proteínas e níveis de TBARS. Os resultados mostraram que a atividade da acetilcolinesterase (AChE) cerebral diminuiu significativamente em ambas as espécies expostas, porém no tecido muscular não se observaram alterações significativas. Houve um decréscimo nos parâmetros hematológicos no sangue de piavas expostas. Após exposição ao glyphosate, as duas espécies demonstraram desordens metabólicas. Em piavas, ocorreu uma redução nos níveis de glicogênio e um aumento nos níveis de glicose no tecido hepático, porém uma significativa redução do glicogênio e glicose muscular. As concentrações de lactato e proteína apresentaram

uma diminuição no tecido hepático após exposição a todas as concentrações deste herbicida, porém no tecido muscular houve um aumento destes metabólitos. Os níveis de amônia aumentaram em ambos tecidos após exposição às diferentes concentrações do glyphosate. Em jundiás, a glicose esteve reduzida no fígado e aumentada no músculo. Houve um aumento do glicogênio hepático, mas uma redução do glicogênio muscular em ambas as concentrações testadas. Após exposição a este herbicida, os níveis de lactato estavam aumentados em ambos tecidos. Os níveis de proteína estavam aumentados no tecido hepático e diminuídos no tecido muscular, enquanto os níveis de amônia estavam aumentados em ambas as concentrações e tecidos testados. A atividade da enzima antioxidante catalase apresentou um aumento em jundiás expostos, porém em piavas não houve alterações. Os níveis de TBARS em jundiás mostraram uma elevação no tecido muscular enquanto em piavas houve um aumento no tecido hepático. Observou-se um aumento na formação de proteína carbonila em fígado de jundiás. Além disso, houve aumento nos parâmetros do muco (glicose e proteína) em piavas expostas. Estes resultados indicam que os parâmetros medidos podem ser bons indicadores da contaminação deste herbicida em piavas e jundiás da região Sul.

*Palavras-chave:* glyphosate; piava (*Leporinus obtusidens*); jundiá (*Rhamdia quelen*); enzimologia; hematologia; metabolismo; estresse oxidativo; muco.



## **ABSTRACT**

Doctoral Thesis  
Post-Graduate Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry  
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

### **Toxicological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*) and jundiá (*Rhamdia quelen*) after exposure to commercial formulation of glyphosate**

AUTHOR: LISSANDRA GLUSCZAK

ADVISOR: VANIA LUCIA LORO

Date and place of defence: February 15<sup>th</sup>, 2008, Santa Maria

The commercial formulations of glyphosate herbicide have been widely used in agriculture and pisciculture for controlling plant weeds. Fish can be affected when drainage water reaches water courses, causing a disturbance in the aquatic ecosystem. Therefore, the aim of this study was to investigate whether exposure to a commercial formulation of glyphosate affects toxicological parameters in piavas (*Leporinus obtusidens*) and jundiás (*Rhamdia quelen*). Piavas were exposed to: 0 (control), 3, 6, 10 or 20 mg/L of glyphosate (480 g/L) and jundiás to 0 (control), 0.2 or 0.4 mg/L, both for 96 h. Enzymatic (AChE), hematological (hematocrit, hemoglobin and erythrocyte and leucocyte count) and metabolic (glucose, glycogen, lactate, protein and ammonia) parameters were analyzed in different tissues of these species. In addition, oxidative stress parameters, such as activity of the antioxidant enzyme catalase, protein carbonilation and TBARS levels were analyzed. The results showed that brain acetylcholinesterase (AChE) activity decreased significantly in both species exposed, but there was no significant change in the muscle tissue. There was a decrease in hematological parameters in blood of piavas. After exposure to this herbicide, both species demonstrated metabolic disorders. In piavas, there was a reduction of glycogen and an increase of glucose in hepatic tissue, and a reduction of muscle glycogen and glucose. Lactate and protein showed a decrease in hepatic tissue after exposure to all concentrations of the herbicide, but in muscle tissue there was an increase in these metabolites. The levels of ammonia increased

in both tissues after exposure, varying with the glyphosate concentration. In jundiás, there was an increase of hepatic glycogen, but a reduction of muscle glycogen at both concentrations tested. Glucose showed a decrease in liver and increase in muscle. After exposure to this herbicide, the levels of lactate were increased in both tissues. The levels of protein were increased in hepatic tissue and decreased in muscle tissue, while the levels of ammonia showed an increase at both herbicide concentrations in both tissues tested. Catalase activity showed an increase in jundiás, but not in piavas. TBARS levels showed an elevation in muscle tissue in jundiás while in piavas there was an increase in hepatic tissue. An increase in protein carbonyl formation in liver of jundiás was observed. In addition, there was an increase in mucus parameters in piavas. These results indicate that the parameters measured may be good indicators of herbicide contamination in piavas and jundiás of the southern region of Brazil.

*Key words:* glyphosate; piava (*Leporinus obtusidens*); jundiá (*Rhamdia quelen*); enzymology; hematological; metabolism; antioxidant; mucus.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

FIGURA 1 – Exemplar de piava ( <i>Leporinus obtusidens</i> ) adulto.....	23
FIGURA 2 – Exemplar de jundiá ( <i>Rhamdia quelen</i> ) adulto .....	24
FIGURA 3 – Estrutura do composto glyphosate (ácido N-fosfometilglicina) .....	27
FIGURA 4 – Hidrólise da acetilcolina (ACh) pela enzima acetilcolinesterase (AChE).....	28
FIGURA 5 – Dano oxidativo a macromoléculas biológicas.....	34

### ARTIGO I

FIGURE 1 – AChE activity in the brain and muscle of piava ( <i>Leporinus obtusidens</i> ) exposed to Roundup® (96 h).. .....	41
--	----

### MANUSCRITO

FIGURE 1 – TBARS levels (nmol MDA/mg protein) in brain, liver and white muscle of <i>Leporinus obtusidens</i> exposed to glyphosate for 96 h.....	63
FIGURE 2 – Catalase activity ( $\mu\text{mol/mg protein/min}$ ) in liver of <i>Leporinus obtusidens</i> exposed to glyphosate (96 h).....	64
FIGURE 3 – Protein carbonyl (nmol carbonyl/mg protein) in liver of <i>Leporinus obtusidens</i> exposed to glyphosate for 96 h. ....	65

### ARTIGO II

FIGURE 1 – AChE activity in the brain and white muscle of jundiá ( <i>Rhamdia quelen</i> ) exposed to Roundup® (96 h).....	70
FIGURE 2 – TBARS levels (nmol MDA/mg of protein) in the brain, liver and white muscle of <i>Rhamdia quelen</i> exposed to 0.2 and 0.4 mg/L of Roundup® for 96 h exposure. ....	70

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO I:

TABLE 1 - Hepatic and white muscle metabolites of *Leporinus obtusidens* exposed to different concentrations of Roundup for 96 h.....41

TABLE 2 – Hematological parameters of *Leporinus obtusidens* after Roundup exposure (96 h).....42

### MANUSCRITO:

TABLE 1 - Protein and glucose levels of the mucus layer of *Leporinus obtusidens* after glyphosate exposure (96 h).....66

TABLE 2 - Plasma metabolic parameters in *Leporinus obtusidens* after glyphosate exposure (96 h).....66

### ARTIGO II:

TABLE 1 – Hepatic and white muscle metabolites of *Rhamdia quelen* exposed to different concentrations of glyphosate for 96 h.....70

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACh: acetilcolina

AChE: acetilcolinesterase

AMPA: ácido aminometilfosfônico

e.a.: ácido equivalente

BChE: butirilcolinesterase

CAT: catalase

CL<sub>50</sub>: concentração letal para 50% dos indivíduos testados

DNPH: 2,4-dinitrophenylhidrazine

DTNB: 5,5' dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)

EPSPs: enol-piruvil-shiquimato-fosfato sintase

EROs: espécies reativas de oxigênio

GPx: Glutathione peroxidase

GSH: Glutathione reduzida

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio

IPA: isopropilamina

LPO: peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados

MDA: malondialdeído

POEA: polioxietilenoamino

TBA: 2-ácido tiobarbitúrico

TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

SDS: lauril sulfato de sódio ou duodecil sulfato de sódio

SOD: superóxido dismutase

## LISTA DE ESQUEMAS

### Discussão

Esquema 1 - Algumas alterações observadas em piavas ( <i>Leporinus obtusidens</i> ) após exposição a uma formulação comercial do herbicida glyphosate.....	79
Esquema 2 - Algumas alterações observadas em jundiás ( <i>Rhamdia quelen</i> ) após exposição a uma formulação comercial do herbicida glyphosate.....	80

## SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	9
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	11
LISTA DE TABELAS.....	12
LISTA DE ABREVIATURAS.....	13
LISTA DE ESQUEMAS.....	14
APRESENTAÇÃO.....	17
1 INTRODUÇÃO.....	18
2 OBJETIVOS.....	21
2.1 Objetivo geral.....	21
2.2 Objetivos específicos.....	21
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
3.1 Piava ( <i>Leporinus obtusidens</i> ).....	23
3.2 Jundiá ( <i>Rhamdia quelen</i> ).....	24
3.3 Herbicida Glyphosate.....	25
3.4 Enzima Acetilcolinesterase.....	28
3.5 Hematologia.....	29
3.6 Parâmetros Metabólicos.....	30
3.7 Estresse Oxidativo.....	32
3.8 Muco.....	36
4 ARTIGOS E MANUSCRITO CIENTÍFICOS	

<b>4.1 Artigo I: Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (<i>Leporinus obtusidens</i>).</b>	
Lissandra Gluszczak, Denise dos Santos Miron, Márcia Crestani, Milene Braga da Fonseca, Fábio de Araújo Pedron, Marta Frescura Duarte, Vânia Lúcia Pimentel Vieira.....	38
<b>4.2 Manuscrito: Acute exposure to glyphosate herbicide affects oxidative parameters in piava (<i>Leporinus obtusidens</i>).</b>	
Lissandra Gluszczak, Vânia Lúcia Loro*, Bibiana Silveira Moraes, Alice Raabe, Marta Frescura Duarte, Alexandra Pretto, Milene Braga da Fonseca and Charlene Cavalheiro.....	44
<b>4.3 Artigo II: Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (<i>Rhamdia quelen</i>).</b>	
Lissandra Gluszczak, Denise dos Santos Miron, Bibiana Silveira Moraes, Róli Rodrigues Simões, Maria Rosa Chitolina Schetinger, Vera Maria Morsch, Vânia Lúcia Loro.....	67
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>74</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>81</b>
<b>7 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>82</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>83</b>
<b>DEMAIS TRABALHOS DESENVOLVIDOS DURANTE O CURSO DE DOUTORADO.....</b>	<b>93</b>



## APRESENTAÇÃO

Esta tese apresenta os resultados sob a forma de artigos e manuscrito, os quais encontram-se no item **ARTIGOS E MANUSCRITO CIENTÍFICOS**. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se nos próprios artigos e manuscrito e representam a íntegra deste trabalho.

No final desta tese encontram-se os itens **DISCUSSÃO E CONCLUSÕES**, nos quais há interpretações e comentários gerais sobre os artigos e manuscrito científicos contidos neste estudo.

No item **PERSPECTIVAS** estão expostos os possíveis estudos para continuação do estudo do autor, referente a esse assunto. As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA, DISCUSSÃO e CONCLUSÕES** desta tese.

No **último item** encontram-se os demais trabalhos desenvolvidos durante o Curso de Doutorado.

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente, tem-se observado um aumento no uso de herbicidas na agricultura e na piscicultura para o controle de plantas daninhas. Algumas culturas fazem com que as águas retornem aos rios, podendo, desse modo, afetar diretamente ou indiretamente a vida de muitos organismos não-alvo, como os peixes (CARR & CHAMBERS, 1996; ORUÇ & ÜNER, 1999, GIESY *et al.*, 2000; JIRAUNGKOORSKUL *et al.*, 2002).

O sal de isopropilamina (IPA) do ácido N-fosfometilglicina (glyphosate) é um herbicida registrado no Brasil para o controle não seletivo de mono e dicotiledôneas em pós-emergência em diversas culturas. É um inibidor da enzima enol-piruvilshiquimato-fosfato sintase – EPSPs – a qual é responsável por uma das etapas de formação dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano. O princípio ativo também inibe a fotossíntese, a síntese dos ácidos nucléicos e estimula a produção de etileno. Além disso, esse herbicida é metabolizado lentamente no solo a ácido aminometilfosfônico (AMPA) (GIESY *et al.*, 2000; RODRIGUES & ALMEIDA, 2005).

Considerando os efeitos do herbicida sobre o vegetal e a possibilidade de contaminação da água, torna-se de interesse analisar os possíveis efeitos tóxicos do glyphosate em peixes nativos da Região Sul do Rio Grande do Sul, como piavas e jundiás. No Brasil, existem poucos estudos abordando toxicidade de herbicidas em peixes, principalmente em espécies nativas. Inclusive, o cultivo dessas espécies vem crescendo progressivamente no Sul e ambas possuem boa aceitação comercial.

Para isso, parâmetros relacionados à toxicologia de herbicidas devem ser avaliados. A medida da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) é um dos parâmetros utilizados para avaliar a toxicidade de herbicidas em peixes. A AChE tem sido usada como um marcador para diagnosticar a exposição de compostos como carbamatos e organofosforados (SANCHO *et al.*, 2000). Pesticidas em geral, ao inibir a AChE, induzem um acúmulo de acetilcolina levando à superestimulação dos receptores nicotínicos e muscarínicos. Como consequência, esses distúrbios podem

afetar a locomoção e o equilíbrio dos organismos expostos e causar efeitos imprevisíveis (FERNÁNDEZ-VEGA *et al.*, 2002; MIRON *et al.*, 2005).

Outros parâmetros utilizados incluem os índices hematológicos, considerados bons indicadores de toxicidade em organismos terrestres e aquáticos. As condições de anemia são em geral detectadas por redução no hematócrito, conteúdo de hemoglobina, contagem de eritrócitos e leucócitos. Ademais, a presença de herbicidas na água pode acarretar alterações fisiológicas em peixes. Essas alterações podem ser avaliadas pelo estudo de parâmetros metabólicos em diferentes tecidos (SANCHO *et al.*, 2000; CRESTANI *et al.*, 2006).

Poluentes ambientais podem provocar estresse oxidativo em peixes e em um grande número de organismos aquáticos, levando a um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (WINSTON, 1991; SEVGILER *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2004). Devido à alta reatividade dessas espécies, podem ocorrer danos a estrutura e função celular como lipídios, carboidratos ou ácidos nucleicos, levando a modificações e/ou perda desta função (VAL *et al.*, 1996). Mecanismos de defesa (sistema antioxidante) têm sido desenvolvidos por diferentes organismos para prevenir e interceptar a formação de oxiradicais e ainda reparar moléculas oxidadas (LI *et al.*, 2003; SEVGILER *et al.*, 2007). A peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados (LPO) e o aumento da carbonilação de proteínas induzida por poluentes ambientais são algumas das principais causas de doenças que ocorrem em peixes, como distrofias musculares nutricionais e hemólises (LI *et al.*, 2003; PARVEZ & RAISUDDIN, 2005).

Além dos parâmetros citados, a análise da composição do muco dos peixes pode ser utilizada como uma medida complementar para avaliar a toxicidade de herbicidas. A pele do peixe é constituída pela derme e epiderme. A última é formada por células que excretam um muco viscoso que o ajuda a escorregar na água (diminuir o atrito), além de protegê-lo do ataque de certos micróbios, fungos, bactérias e parasitas (HINTON *et al.*, 2001). Possíveis alterações na composição do muco poderão ser observadas devido às alterações induzidas pelo herbicida. As exposições ao herbicida e alterações no muco podem reduzir a imunidade e os processos de defesa do peixe.

Portanto, considerando a importância regional destas espécies de peixes e o uso crescente de herbicidas nas culturas agrícolas, pretende-se verificar se a exposição a uma formulação comercial glyphosate causa efeitos adversos nos parâmetros acima citados.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi verificar se a exposição a uma formulação comercial do herbicida glyphosate altera parâmetros enzimáticos, hematológicos e metabólicos em piavas (*Leporinus obtusidens*) e jundiás (*Rhamdia quelen*).

### 2.2 Objetivos Específicos

Verificar os efeitos da exposição a uma formulação comercial de glyphosate em piavas e jundiás através da determinação dos seguintes parâmetros:

- Atividade da enzima acetilcolinesterase de cérebro e músculo;
- índices hematológicos no sangue de piavas e dosagem de metabólitos em fígado e músculo de ambas espécies;
- atividade da enzima antioxidante catalase em fígado;
- formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em diferentes tecidos de ambas espécies e níveis de carbonilação de proteínas em fígado de piavas;
- determinação da composição do muco de piava, medindo-se a concentração de açúcares solúveis e proteína.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Piava (*Leporinus obtusidens*)

A piava (*Leporinus obtusidens*) (Figura 1) está presente nos estados do Centro-Oeste, Sudeste e Sul do Brasil (HAYASHI *et al.*, 1996). O cultivo do *Leporinus obtusidens* é de grande interesse por tratar-se de uma espécie nativa do RS, também por sua rusticidade e boa aceitação comercial. Segundo Hayashi *et al.* (1996) as espécies do gênero *Leporinus* apresentam grande potencial para a piscicultura, pois são significativamente importantes na pesca extrativista, atingindo porte médio a grande, um bom valor comercial e ocorrendo em grande número nos rios e reservatórios de hidrelétricas.

A piava pertence à família dos Anostomídeos, dentro dos Characiformes é uma das mais complexas, pois abrange uma ampla quantidade de espécies. O gênero *Leporinus* inclui peixes conhecidos popularmente como piau, piauçu, piapara e piava (BALDISSEROTTO *et al.*, 2005). Esse gênero encontra-se amplamente distribuído na Colômbia, nas Guianas, na Amazônia e nos rios Araguaia, São Francisco, Paraguai, Paraná, Grande, Pardo, Parnaíba, Tietê, Mogi-Guaçu, da Prata e Uruguai (NOMURA, 1984; GODOY, 1987).

Essas espécies são essencialmente omnívoras, alimentando-se preferencialmente de vegetais, insetos e briozoários (ANDRIAN *et al.*, 1994; BALDISSEROTTO *et al.*, 2005). Sua maturação sexual ocorre quando o peixe atinge cerca de 199 mm de comprimento total. Nos meses de dezembro e janeiro se concentra o período reprodutivo, apresentando desova total. Segundo Júnior & Mourgués-Schurter (2001) esta espécie mantém seu consumo de alimentos, independente do horário de fornecimento da ração podendo ser alimentadas a qualquer hora do dia, adaptando-se bem às condições de cativeiro. Além disso, o comportamento observado nesse peixe demonstrou uma formação de hierarquia logo após o fornecimento da ração.

Dentre as espécies nativas do Rio Grande do Sul, a piava (*Leporinus obtusidens*) está se destacando como uma das mais promissoras para o cultivo, pois foi escolhida como o peixe bioindicador das bacias do Vacacaí e Vacacaí-Mirim. São muito conhecidas pelos pescadores comerciais, esportivos e colecionadores de peixes ornamentais.



Figura 1 – Exemplar de piava (*Leporinus obtusidens*) adulto.

### 3.2 Jundiá (*Rhamdia quelen*)

No Brasil, o jundiá (*Rhamdia quelen*) (Figura 2) está presente na região da Depressão Central do Rio Grande do Sul, sendo também encontrado desde o centro da Argentina até o sul do México (GUEDES, 1980).

O jundiá é uma das espécies mais promissoras para o cultivo no Rio Grande do Sul, pois apresenta crescimento rápido com fácil adaptação a temperaturas variáveis e ao manejo de criações intensivas. Pelo fato dos alevinos serem aclimatados a 31°C e suportarem temperaturas de 15 a 34°C, podem ser considerados euritérmicos. O crescimento do jundiá aumenta com a elevação da temperatura, logo nos primeiros anos de vida. Os machos possuem taxa de crescimento maior que as fêmeas até o terceiro ou quarto ano de vida, porém após esse período a situação se inverte (comprimento teórico máximo: 52,0 cm para os machos e 66,5 cm para as fêmeas). As fêmeas apresentam maior comprimento e

idade que os machos (21 anos e 11 anos, respectivamente). A maturidade sexual é atingida em torno de um ano de vida em ambos os sexos. Ele possui dois picos reprodutivos por ano (um no verão e outro na primavera). A coloração do *Rhamdia quelen* varia de marrom-avermelhado claro a cinza ardósia. Um melhoramento genético deste peixe produziu o chamado jundiá-cinza, o qual, segundo alguns criadores, teria melhor rendimento para a piscicultura. Uma outra variação é o jundiá-albino ou branco, podendo ser “rosa”. No Brasil, ele é conhecido também como jundiá-tinga, jandiá, jandiá-tinga, mandi e sapipoca. Já na Argentina, é conhecido como bagre, bagre-negro, bagre-sapo e bagre-sul-americano. Em inglês, seu nome comum é *silver catfish* (GOMES *et al.*, 2000; BALDISSEROTTO *et al.*, 2005).

O jundiá (*Rhamdia quelen*) vive em lagos e poços fundos dos rios junto às margens e vegetação. Esconde-se entre troncos apodrecidos e pedras, saindo à noite, principalmente depois das chuvas, à procura de alimento. O alimento artificial mais recomendado para larvas de jundiá está baseado em lecitina de soja, fígado bovino e levedura (PIAIA & RADÜNZ NETO, 1997a). Possui hábito omnívoro, alimentando-se preferencialmente de crustáceos, insetos, restos vegetais e detritos orgânicos (GUEDES, 1980).



Figura 2 – Exemplar de jundiá (*Rhamdia quelen*) adulto.



### 3.3 Herbicida Glyphosate

O uso de agrotóxicos na piscicultura e na agricultura serve para o controle de parasitas. No entanto, o uso intensivo e inadequado desses produtos pode aumentar a poluição ambiental, já que esses químicos podem causar a contaminação da água por serem usados no solo ou próximo deles. O uso indiscriminado desses agrotóxicos pode afetar também organismos aquáticos, incluindo os peixes (JIRAUNGKOORSKUL *et al.*, 2002; TSUI & CHU, 2003; MIRON *et al.*, 2005; CRESTANI *et al.*, 2006; MORAES *et al.*, 2007; FONSECA *et al.*, 2008).

As propriedades herbicidas do glyphosate foram descobertas em 1970, e a formulação comercial foi primeiramente introduzida em 1974 (GIESY *et al.*, 2000). Há inúmeras formulações de herbicidas baseados em glyphosate, todas contêm os mesmos ingredientes básicos: sal de isopropilamina (IPA) do ácido N-fosfometilglicina, um surfactante e a água. No entanto, o Rodeo<sup>®</sup> é uma formulação do herbicida glyphosate que não contém surfactante. No Brasil, o Roundup<sup>®</sup> possui o mesmo nome comercial na América do Norte, porém em outros países existem vários nomes como: Sting, Alphee, Azural e Faena. Frequentemente a concentração de glyphosate dessas formulações é o ácido equivalente (e.a.) 360 g/L. Entretanto não é assim em todos os casos. Certas formulações possuem uma base diluída com água a fim de obter produtos mais diluídos que contêm 240, 160, 120 ou 9 g/L de ácido equivalente. Nesse estudo foi utilizada uma formulação comercial de glyphosate 480 g/L de ácido equivalente e 692 g/L de ingredientes inertes (Monsanto Company, St Louis MO, EUA). A classe toxicológica deste herbicida é a IV (quatro), o que indica baixa toxicidade (RODRIGUES & ALMEIDA, 2005). Segundo estudos, para registrar um produto nos Estados Unidos são realizados em torno de 20 testes, mas somente 7 testes são feitos para os ingredientes inertes (curto período), o restante é feito apenas com o ingrediente ativo (longa duração) (COX & SURGAN, 2006).

Vale ressaltar que adjuvantes são ingredientes que facilitam ou modificam a ação do ingrediente ativo principal, enquanto ingredientes inertes são corantes ou

outros químicos que não afetam o alvo ou modificam a ação do pesticida (BRAUSCH & SMITH, 2007). Os ingredientes inertes atuam como solventes, surfactantes, conservantes e possuem outras funções. Estes, por sua vez, são raramente identificados nos rótulos dos produtos químicos, pois são informações confidenciais. Um único produto químico pode ter vários ingredientes inertes. A utilização desses ingredientes inertes pode aumentar a persistência do pesticida no ambiente, podendo afetar o comportamento dos ingredientes ativos e em algumas vezes a sua volatilização. Pesquisas indicam que muitos ingredientes inertes podem afetar a saúde humana e o meio ambiente (COX & SURGAN, 2006).

Diferentes formulações do herbicida glyphosate são utilizadas em lavouras de arroz e soja no sul do Brasil, possuindo alta eficiência contra 90 tipos de gramíneas emergidas e ervas daninhas de folha larga (SMITH & OEHME, 1992). É um herbicida de amplo-espectro, servindo também para o controle da erva daninha aquática em lagos, canais e água corrente. Esse produto (glyphosate) possui grande solubilidade em água (15,700 mg/L a 25°C e pH 7) e meia-vida de 30 a 90 dias, dependendo do tipo de solo e do nível de matéria orgânica (RODRIGUES & ALMEIDA, 2005).

O POEA (polioxietilenoamino) é adicionado nas formulações para facilitar a penetração do ingrediente ativo glyphosate nas cutículas das plantas. De acordo com alguns estudos, o glyphosate não apresenta perigo em exposição aguda. No entanto, o componente POEA, freqüentemente usado na composição deste, potencializa sua ação e chega a ser de duas a três vezes mais tóxico que o glyphosate em si (GIESY *et al.*, 2000). Muitos surfactantes têm valores para a CL<sub>50</sub> de organismos aquáticos na faixa de 1 a > 100 mg/L, os quais podem ser classificados como praticamente não tóxicos (GIESY *et al.*, 2000). Roundup<sup>®</sup> possui valores de CL<sub>50</sub> de 4,2 a 52 mg/L comparado aos valores do glyphosate que são de 22 a >1000 mg/L. A grande toxicidade aquática do Roundup<sup>®</sup> comparada ao seu ingrediente ativo glyphosate é atribuída ao POEA. Alguns estudos revelaram que o valor de CL<sub>50</sub> do Roundup<sup>®</sup> em 96 h para truta arco-íris foi de 8,3 mg/L (2,6 mg e.a./L), enquanto que a CL<sub>50</sub> do glyphosate, no mesmo estudo, foi de 140 mg e.a./L. Martinez & Langiano (2008) realizaram trabalhos com *Prochilodus lineatus* e

obtiveram a  $CL_{50}$  de 13,69 mg/L após exposição (96 h) a uma formulação de Roundup contendo 41% de glyphosate. Já Soso *et al.* (2007) trabalharam com jundiás (*Rhamdia quelen*) e obtiveram a  $CL_{50}$  de 3,6 mg/L após exposição de 96 h ao herbicida Roundup®WG contendo 64% de glyphosate.

O glyphosate (Figura 3) pertence ao grupo químico das glicinas e apresenta a estrutura abaixo.

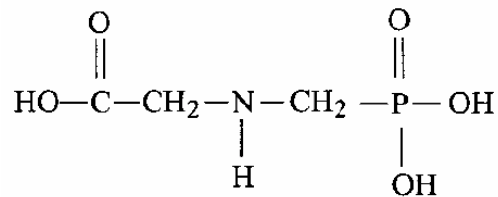


Figura 3 - Estrutura do composto glyphosate (ácido N-fosfonometilglicina) (adaptado de RODRIGUES & ALMEIDA, 2005).

Este composto é encontrado na fórmula comercial de concentrado solúvel (ROUNDUP®;TROP®). Para simples aplicações, a taxa entre 840 – 2520 g/e.a. são as mais comuns, tendo uma aplicação máxima de 4.200 g/e.a., dependendo da espécie e do estágio de desenvolvimento das plantas a serem controladas. Esse herbicida pertence ao grupo de inibidores da enzima enol-piruvil-shiquimato-fosfato sintase – EPSPs – a qual é responsável por uma das etapas da síntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano. Conseqüentemente ocorre a elevação dos níveis de amônia fitotóxica, assim como de glutamina e glutamato. O glyphosate também inibe a fotossíntese, a síntese dos ácidos nucléicos e estimula a produção de etileno, provocando o amarelecimento progressivo das folhas, murchamento e posterior necrose e morte das plantas, o que demora cerca de 4 - 20 dias. Ele é metabolizado lentamente a ácido aminometilfosfônico (GIESY *et al.*, 2000; RODRIGUES & ALMEIDA, 2005). As culturas podem ser plantadas logo após a sua aplicação, pelo fato da forte adsorção ao solo (TOMLIN, 2000; RODRIGUES & ALMEIDA, 2005; CARVALHO, 2007). Os peixes são suscetíveis à exposição de contaminantes através da sua dieta, mas a captação direta desses químicos presentes na água é através das brânquias e superfície do corpo. Entretanto,

existem poucos estudos na literatura relacionados a aspectos toxicológicos de pesticidas em peixes, bem como de seus efeitos no meio ambiente.

### 3.4 Enzima Acetilcolinesterase

As colinesterases são enzimas que estão amplamente distribuídas entre os mamíferos. Elas dividem-se em duas famílias principais: acetilcolinesterase (AChE; E.C. 3.1.1.7) (Figura 4) e butirilcolinesterase (BChE; E.C.3.1.1.8). Cada uma possui características e propriedades particulares que permitem distingui-las uma da outra (MASSOULIE *et al.*, 1993; CHUIKO *et al.*, 2000). Dependendo da colinesterase considerada, a concentração do substrato pode influenciar a atividade enzimática, já que a AChE é inibida por excesso de substrato enquanto a BChE não apresenta tal efeito (NUNES-TAVARES *et al.*, 2002).

As colinesterases desempenham papéis importantes na neurotransmissão colinérgica central e periférica, hidrolisando ésteres de colina (BRETAUD *et al.*, 2000; FERNÁNDEZ-VEGA *et al.*, 2002; CHUIKO *et al.*, 2003; ROEX *et al.*, 2003). Além de hidrolizar ésteres de colina, as colinesterases auxiliam na detoxificação de alguns xenobióticos (BRETAUD *et al.*, 2000; ROEX *et al.*, 2003).

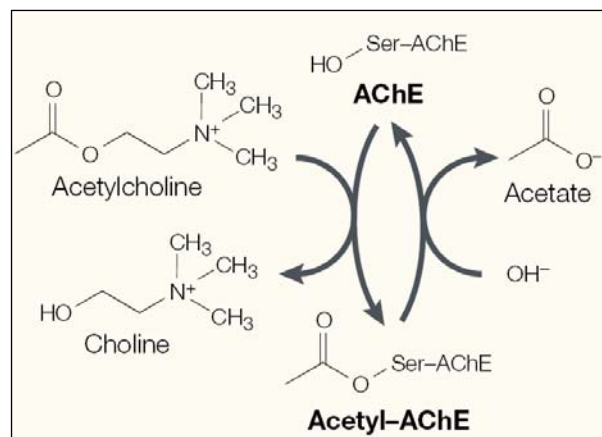


Figura 4 - Hidrólise da acetilcolina (ACh) pela enzima acetilcolinesterase (AChE) (adaptado de SOREQ & SEIDMAN, 2001).

A atividade da AChE cerebral pode ser afetada por alguns fatores como, por exemplo, a temperatura ambiental, espécie, ciclo reprodutivo, sexo, idade, etc (YI *et al.*, 2006). Se a atividade da 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 (PAN *et al.*, 1998; SAGLIO & TRIJASSE, 1998; SANCHO *et al.*, 2000; FERNÁNDEZ-VEGA *et al.*, 2002; MIRON *et al.*, 2005). Em geral, os peixes intoxicados com inseticidas anticolinesterásicos mostram sinais de paralisia muscular, hiperatividade e perda de equilíbrio (CERÓN *et al.*, 1996). Sabe-se que agentes pesticidas, tais como os organofosforados (malation e paration) são inibidores potentes de colinesterases (MASSOULIÉ *et al.*, 1993). Além disso, a atividade da AChE cerebral tem sido modificada por outras classes de pesticidas, como o organoclorado endosulfan (DUTTA & ARENDS, 2003) e a isoxazolidinona clomazone (MIRON *et al.*, 2005; CRESTANI *et al.*, 2007). Recentes estudos têm demonstrado a correlação entre o comportamento dos peixes e a inibição da atividade da acetilcolinesterase em determinadas espécies, sugerindo assim, que a medida da atividade da AChE pode fornecer informações úteis sobre o impacto de substâncias tóxicas presentes no meio aquático (CHANDRASEKARA *et al.*, 2007).

### **3.5 Hematologia**

A análise do quadro hematológico em peixes facilita a compreensão da fisiologia comparativa, relação filogenética, condições alimentares e outros parâmetros ecológicos (ROCHE & BOGÉ, 2000; SANCHO *et al.*, 2000).

Diversas mudanças que ocorrem na circulação sangüínea e nos tecidos dos peixes são geradas pelo estresse ambiental (JYOTHI & NARAYAN, 1999; ROCHE & BOGÉ, 2000). Assim, parâmetros hematológicos do peixe estão sendo utilizados no estudo de toxicologia e das variações ambientais. Os parâmetros do sangue como

hematócrito, conteúdo de hemoglobina, número de leucócitos e eritrócitos podem indicar respostas ao estresse fisiológico. A redução nesses valores poderá acarretar um estado de anemia em peixes expostos ao herbicida. Há três tipos de anemia que podem ser diferenciadas de acordo com este mecanismo patofisiológico: anemia hemorrágica, hemolítica e não regenerativa (SANCHO *et al.*, 2000).

As análises hematológicas em peixes não são utilizadas com frequência para diagnosticar doenças. O fator limitante dessas análises, em diferentes espécies de peixes, está na variação dos tipos, números e aparências dos leucócitos. Além disso, a considerável variação dos valores de leucócitos em peixes saudáveis, mesmo entre as mesmas espécies, é também causada pelas diferentes metodologias usadas, bem como pela interpretação subjetiva dos tipos de células pelo investigador (PIMPÃO *et al.*, 2007).

### **3.6 Parâmetros Metabólicos**

O metabolismo dos peixes é semelhante ao dos mamíferos, porém os peixes possuem uma maior quantidade de musculatura branca. O peixe utiliza com muita frequência o metabolismo anaeróbico em situação de estresse. Esse é um mecanismo de compensação fisiológica que o organismo adapta em resposta a fatores físicos ou químicos que são agentes estressantes (CORNISH & MOON, 1985). Geralmente, os organismos são expostos a baixas concentrações de herbicidas, o que pode provocar efeitos sub-letais a longo prazo, e raramente, efeitos letais (SANCHO *et al.*, 1998).

O fígado desempenha um papel central no metabolismo: processa, distribui e fornece uma mistura de nutrientes para todos os outros órgãos e tecidos através da circulação. É o órgão detoxificador, sendo o primeiro a reagir após estresse causado por substâncias tóxicas. Funciona como uma bomba de glicose nos organismos vertebrados, regulando seus níveis na corrente sangüínea (LEHNINGER *et al.*, 2002).

O tecido hepático é um órgão envolvido nos processos metabólicos como glicogênese, glicogenólise, gliconeogênese e glicólise (RAHAMI & ABDOLLAHI, 2007). A glicogênese é o processo de síntese do glicogênio a partir de moléculas de glicose o qual envolve várias enzimas como a hexoquinase, glicoquinase e glicogênio sintase. Já a glicogenólise é o catabolismo do glicogênio, o qual resulta da quebra do glicogênio em moléculas de glicose e é catalisado pelas enzimas glicogênio fosforilase, fosfoglicomutase e glicose-6-fosfatase. A glicólise, por sua vez, envolve uma série de reações bioquímicas pelas quais uma molécula de glicose é oxidada por duas moléculas de ácido pirúvico e é catalisada pelas enzimas hexoquinase, fosfofrutoquinase e lactato desidrogenase. E por fim, a gliconeogênese gera moléculas de glicose por outras moléculas orgânicas como piruvato, lactato, glicerol e alguns aminoácidos (RAHAMI & ABDOLLAHI, 2007).

Diversos estudos comprovam alterações fisiológicas observadas em peixes como resposta a exposição à contaminantes ambientais como agrotóxicos (JYOTHI & NARAYAN, 1999; ORUÇ & ÜNER, 1999; BEGUM, 2004). Segundo Bidinotto *et al.* (1997) o estresse ambiental pode afetar o conteúdo de glicogênio refletindo em uma adaptação bioquímica. Para suprir a demanda de energia elevada dos peixes após o estresse, o glicogênio é degradado, ocasionando perdas enormes dessa reserva de glicose (SANCHO *et al.*, 1998).

Alterações metabólicas são observadas nos níveis de lactato, glicose e proteína plasmática em peixes expostos a pesticidas (SANCHO *et al.*, 1997, 1998; DAS & MUKHERJEE, 2003). Os níveis de lactato têm sido muito utilizados como medida do metabolismo anaeróbico após exposição a contaminantes. A hiperglicemia que geralmente ocorre, pode indicar mudanças no metabolismo dos carboidratos nos tecidos (SANCHO *et al.*, 1998). O catabolismo de proteínas pode indicar uma adaptação fisiológica do peixe para compensar a situação de estresse (SANCHO *et al.*, 1998).

O estresse resulta em um aumento na secreção de hormônios como os glicocorticóides e as catecolaminas, os quais são ativos no metabolismo de carboidratos. A hiperglicemia pode ser vista como uma resposta fisiológica do peixe para manter a energia necessária após situação de estresse (JYOTHI & NARAYAN,

1999). Provavelmente, essa hiperglicemia ocorre através dos efeitos das catecolaminas, as quais determinam a glicogenólise hepática (BARCELLOS *et al.*, 2003). Muitos pesticidas podem induzir condições de hipóxia tecidual nos peixes, favorecendo o metabolismo anaeróbico (ORUÇ & ÜNER, 1999). O aumento nos níveis de lactato como uma medida do metabolismo, pode indicar desordens metabólicas e uma resposta rápida contra a depleção de energia, já que a oxidação aeróbica vai estar reduzida (GIMENO *et al.*, 1995; CRESTANI *et al.*, 2006).

São observadas alterações no metabolismo de proteínas em peixes após uma situação de estresse, como hipoproteinemia nos tecidos após exposição a agrotóxicos (SANCHO *et al.*, 2000; FERNÁNDEZ-VEGA *et al.*, 2002). Outra alteração observada foi o aumento da síntese de proteínas após exposição a substâncias tóxicas (SAHIB *et al.*, 1984). Piavas expostas ao herbicida 2,4-D tiveram os níveis de proteína muscular aumentados, provavelmente essa síntese ocorre para compensar perdas protéicas devido ao estresse causado pela exposição ao herbicida (FONSECA *et al.*, 2008).

Como resultado de uma resposta fisiológica, poderá ocorrer elevação nos níveis de amônia devido à amoniogênese nos tecidos hepático e muscular. A amônia é um metabólito tóxico e seu excesso é conhecido por induzir a operação de detoxificação ou sistemas de utilização, principalmente pela via de formação de substâncias nitrogenadas menos tóxicas (BEGUM, 2004).

### **3.7 Estresse Oxidativo**

O elemento oxigênio se encontra em 53,8 % da crosta terrestre e constitui cerca de 21% da composição do ar. Tal composto é indispensável para a produção de energia nos animais e nas plantas. No entanto, existe um paradoxo. Assim como o oxigênio é indispensável para a vida, pode resultar em danos reversíveis ou até irreversíveis quando seres vivos são expostos a ele em concentrações superiores às



encontradas na atmosfera, podendo, inclusive, levar à morte da célula (FRAGA *et al.*, 1996).

Os mecanismos antioxidantes, os quais podem ser enzimáticos e não enzimáticos, surgiram para combater os efeitos deletérios das espécies reativas. O sistema enzimático é formado por diversas enzimas, destacando-se a catalase (CAT), a superóxido dismutase (SOD) e a glutatona peroxidase (GPx). O sistema não-enzimático divide-se em antioxidantes hidrofílicos (glutatona reduzida (GSH), vitamina C, carotenos) e lipofílicos (vitamina A, vitamina E), entre outros (WINSTON & DI GIULIO, 1991).

Os radicais livres são definidos como qualquer espécie química capaz de existência independente que contenha um ou mais elétrons desemparelhados, sendo assim, altamente reativos e capazes de atacar qualquer biomolécula, e de meia vida curta. Ele pode ser aniônico, catiônico ou neutro. Pela sua configuração eletrônica, o oxigênio tende a receber um elétron de cada vez, formando compostos intermediários altamente reativos, como o ânion radical superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila. Então, o ânion radical superóxido é o primeiro intermediário da redução monovalente do oxigênio até água, sendo formado a partir dele os demais EROs (PERES, 1994).

Nas células aeróbicas, essas espécies reativas de oxigênio (EROs) são geradas durante o metabolismo normal, como resultado do metabolismo oxidativo nas membranas. Devido à alta reatividade dessas espécies, pode ocorrer dano a componente de estrutura e função celular, como lipídios, carboidratos ou ácidos nucleicos, levando à modificação e/ou perda da função celular (Figura 5) (VAL *et al.*, 1996).

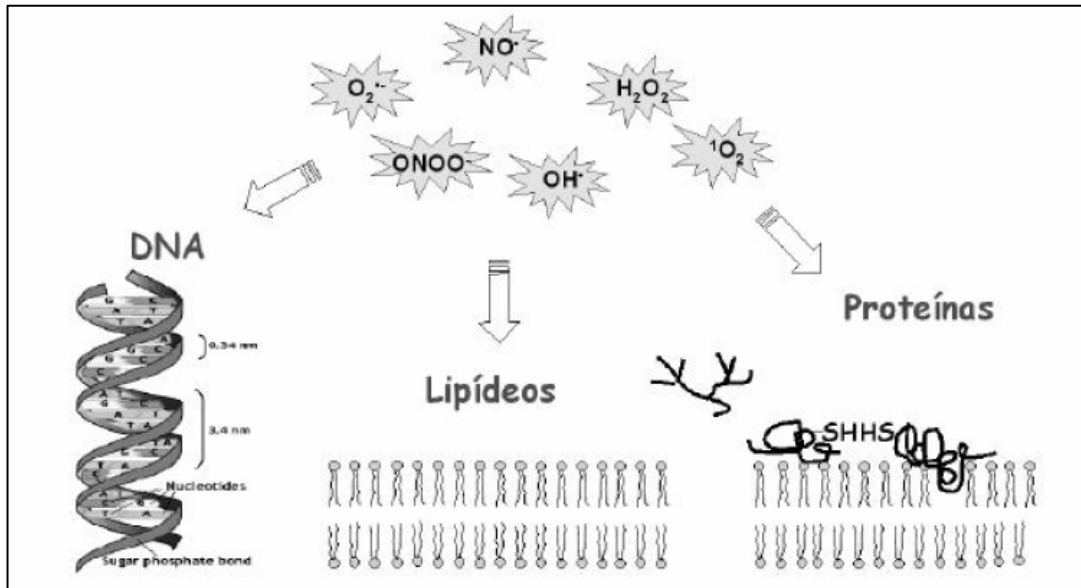


Figura 5 - Dano oxidativo a macromoléculas biológicas (adaptado de TORRES, 2003).

A vida na aerobiose é caracterizada por uma constante produção de radicais livres, a qual é contrabalaneada com uma produção equivalente de mecanismos antioxidantes visando neutralizar seus efeitos deletérios (AHMAD *et al.*, 2000). Quando essa neutralização não é possível devido a uma sobrecarga do mecanismo antioxidante, diz-se que há uma situação de estresse oxidativo. Frente a isso, ocorrem os seguintes processos: adaptação, dano tecidual e morte celular (AHMAD *et al.*, 2000; SEVGILER *et al.*, 2004). Os poluentes ambientais podem provocar estresse oxidativo em um grande número de organismos aquáticos, como os peixes (WINSTON, 1991).

A medida da atividade da enzima antioxidante catalase tem sido usada como um indicador de estresse oxidativo, uma vez que um aumento na sua atividade poderia indicar uma resposta antioxidante. A catalase está localizada principalmente nos peroxissomas e é responsável pela redução de peróxido de hidrogênio e pela proteção contra a oxidação de ácidos graxos insaturados das membranas celulares (ZHANG *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2007). Uma reação típica induzida por EROs envolve a peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados (LPO). A formação de LPO induzida

por poluentes ambientais é uma das principais causas de doenças que ocorrem em peixes, entre elas as distrofias musculares nutricionais e hemólises (LI *et al.*, 2003; SAYEED *et al.*, 2003).

As enzimas antioxidantes são encontradas em todos os tecidos de vertebrados, mas mostram, geralmente, maior atividade no fígado, órgão de captação e transformação enzimática de EROs (ZHANG *et al.*, 2004). Foram observadas alterações nas atividades de enzimas antioxidantes em diversos trabalhos com organismos aquáticos expostos a poluentes ambientais (LI *et al.*, 2003; LIONETTO *et al.*, 2003; SAYEED *et al.*, 2003; ÜNER *et al.*, 2006). Essas alterações enzimáticas podem ser provocadas por um estresse oxidativo devido a uma resposta compensatória ou ainda, dependendo da severidade do estresse, pode suprimir as suas atividades devido ao dano oxidativo e perda de mecanismos compensatórios (LIONETTO *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2004; CRESTANI *et al.*, 2006; MORAES *et al.*, 2007).

EROs podem atacar as enzimas e proteínas estruturais das células, levando a uma modificação oxidativa e, conseqüentemente, a diversos processos fisiológicos e/ou patológicos. Essas modificações podem ser de dois tipos: primárias ou secundárias. As modificações primárias podem ser oxidações catalisadas por um metal, mediadas por radiação e oxidação por ozônio ou óxidos de nitrogênio. Já nas oxidações secundárias as proteínas são modificadas por moléculas geradas pela oxidação de outras moléculas (STEBENS, 2003). Os grupamentos da cadeia lateral de proteínas são alvos para o ataque de radicais livres. Estes, por sua vez, podem atacar os resíduos de aminoácidos (especialmente arginina, lisina, prolina e treonina) para produzir grupos carbonila. A modificação oxidativa das proteínas por espécies reativas faz com que tais proteínas percam sua função tornando-se mais susceptíveis à degradação proteolítica. Muitos estudos têm sugerido que o aumento do conteúdo de carbonilação de proteínas pode servir como um biomarcador complementar de estresse oxidativo em humanos e vertebrados (PEY *et al.*, 2003). Entretanto, poucos estudos foram realizados com peixes (ALMROTH *et al.*, 2005; PARVEZ & RAISUDDIN, 2005).

### 3.8 Muco

A epiderme do peixe está em contato direto com o meio ambiente e o muco é considerado a primeira linha de defesa contra doenças infecciosas. O muco pode não agir apenas como uma barreira física, mas contém muitos componentes como as imunoglobulinas, lisozimas, complemento, proteína-C-reativa e enzimas proteolíticas que podem fazer a prevenção contra infecções microbianas (SHEPHARD, 1994; QUINIOU *et al.*, 1998). A secreção mucosa age também na regulação osmótica (MARSHALL, 1978; TROMEUR *et al.*, 1992).

A maior parte do muco contém mucina, uma glicoproteína que é excelente substrato para o desenvolvimento de bactérias (TROMEUR *et al.*, 1992). O principal componente dessas mucinas são as glicoproteínas macromoleculares, que contém ácido siálico e resíduos de sulfato, antibióticos, bem como metabólitos secundários bioativos (GOTTSCHALK & BHARGAVA, 1972; CAMERON & ENDEAN, 1973; OURTH, 1980).

As baixas temperaturas, assim como outros agentes estressores, reduzem o número de células mucosas da epiderme. A estimulação da secreção mucosa é uma típica resposta de estresse em peixes e tem sido reportada por outros contaminantes como o petróleo bruto, metais pesados incluindo o chumbo, o mercúrio, o cobre e o cromo (KHANGAROT & TRIPATHI, 1992; IGER *et al.*, 1994a). Estudo realizado com filé de peixe (*Carpa capim*) demonstrou alterações no conteúdo de proteína e de carboidrato da camada mucosa em peixes para consumo, indicando assim um possível desenvolvimento microbiano (SCHERER *et al.*, 2006). Apesar de sua importância para a proteção do peixe contra agentes externos, o estudo do muco em peixes expostos a contaminantes ainda é escasso na literatura.

## 4 ARTIGOS CIENTÍFICOS

Os resultados inseridos nesta tese apresentam-se sob a forma de artigos e manuscrito científicos, os quais se encontram aqui estruturados. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se nos próprios artigos e manuscrito. Os artigos estão dispostos da mesma forma que foram publicados na edição das revistas científicas (**Artigos I e II**). No caso do **Manuscrito**, está disposto da mesma maneira que foi submetido.

4.1 Efeito de uma formulação comercial do herbicida glyphosate após exposição aguda de piavas (*Leporinus obtusidens*).

4.1.1 Artigo I

**Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava  
(*Leporinus obtusidens*)**

**Lissandra Gluszczak, Denise dos Santos Miron, Márcia Crestani, Milene Braga da Fonseca, Fábio de Araújo Pedron, Marta Frescura Duarte, Vânia Lúcia Pimentel Vieira**

**Ecotoxicology and Environmental Safety, 65: 237-241, 2006**



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)



**Ecotoxicology  
and  
Environmental  
Safety**

Ecotoxicology and Environmental Safety 65 (2006) 237–241

[www.elsevier.com/locate/ecoenv](http://www.elsevier.com/locate/ecoenv)

## Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*)

Lissandra Glusczak, Denise dos Santos Miron, Márcia Crestani, Milene Braga da Fonseca, Fábio de Araújo Pedron, Marta Frescura Duarte, Vânia Lúcia Pimentel Vieira\*

*Laboratório de Bioquímica Adaptativa, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil*

Received 16 November 2004; received in revised form 26 May 2005; accepted 5 July 2005  
Available online 19 September 2005

### Abstract

In this study, teleostean fish *Leporinus obtusidens* (piava) were exposed to different concentrations of Roundup, a glyphosate (acid equivalent) herbicide: 0 (control), 3, 6, 10, and 20 mg/L for 96 h (short-term). Acetylcholinesterase (AChE) activity was verified in brain and muscle tissues. Metabolic parameters in the liver and muscle (lactate, glycogen, glucose, protein, and ammonia), as well as some hematological parameters, were determined. Unexposed fish exhibited significantly higher brain AChE activity when compared to that of the muscle ( $P < 0.05$ ) ( $13.8 \pm 0.76$  and  $6.1 \pm 1.31$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  protein, respectively). Results indicated that AChE activity significantly decreased in the brain of fish exposed to all glyphosate concentrations tested, but in the muscle this parameter was not altered. In addition, fish exposed to all glyphosate concentrations showed a significant increase in hepatic glycogen and glucose, but a significant reduction in muscle glycogen and glucose. Lactate and protein of fish exposed to all glyphosate concentrations presented a significant decrease in the liver, but did not change significantly in the muscle. Levels of ammonia in both tissues increase in fish at all glyphosate concentrations. Exposure to this herbicide produced a decrease in all hematological parameters tested. These results indicate that AChE activity as well as metabolic and hematological parameters may be good early indicators of herbicide contamination in *L. obtusidens*.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Glyphosate; Herbicide; AChE; Liver; Muscle; Protein; Glucose; Glycogen; Lactate

### 1. Introduction

Herbicide and pesticide contamination of surface waters derived from agricultural practices is a problem of worldwide importance due to aquatic contamination by these products (Oruç and Üner, 1999). Roundup (glyphosate 48%), a commercial formula containing an active ingredient which is the acid equivalent of the isopropylamine salt of glyphosate (*N*-phosphonomethyl glycine), is a nonselective and postemergent herbicide used for controlling aquatic weeds (Abdullah et al.,

1995; Jiraungkoorskul et al., 2002). Glyphosate concentrations used in rice and soybean cultures in Southern Brazil range from 0.36 to 2.16 mg/L. The water solubility of this herbicide is 15,700 mg/L, and its half-life in soil is 30–90 days (Rodrigues and Almeida, 1998). A limited amount of information is available on the toxic characteristics of glyphosate, the surfactants used in its formula, and its effects on fish. According to Giesy et al. (2000), glyphosate does not bioaccumulate in terrestrial or aquatic animals and is widely used in the world due to its high efficiency, its cost effectiveness, and the fact that it is practically nontoxic and readily degradable in the environment.

The piava (*Leporinus obtusidens*) was chosen for this study, since the effect of glyphosate herbicide on fish

\*Corresponding author. Fax: +55 55 220 8240.

E-mail addresses: [vanial@smail.ufsm.br](mailto:vanial@smail.ufsm.br), [vaniluc@yahoo.com.br](mailto:vaniluc@yahoo.com.br) (V.L.P. Vieira).

species, particularly on this one, has scarcely been studied. It was also chosen because it is a native freshwater fish of Southern Brazil with good potential for cultivation and acceptance by consumers (Andrian et al., 1994). Teleost fish may be good indicators of contamination by pollutants because their biochemical responses are quite similar to those found in mammals. The response of some aquatic organisms to pollutants has been studied through the measurement of hematological and physiological parameters (Begum, 2004; Gimeno et al., 1995; Sancho et al., 1998, 2000). Studies of glyphosate toxicity conducted on rodents, dogs, rabbits, aquatic invertebrates, and fish showed that glyphosate, while highly toxic to plants, is relatively nontoxic to animals including fish (Williams et al., 2000). The measurement of acetylcholinesterase (AChE) activity, present in the cholinergic synapses and motor end plates, has been used by different authors as a biomarker to monitor carbamate and organophosphate effects on higher vertebrates, such as fish (Chuiko, 2000; De La Torre et al., 2002; Fernández-Vega et al., 2002). AChE activity is extremely important for many physiological functions of fish, such as prey location, predator evasion, and orientation toward food. When AChE activity decreases Ach is not broken and accumulates within synapses, which therefore cannot function in a normal way (Dutta and Arends, 2003).

The aim of this study was to investigate the effects of short-term glyphosate exposure on AChE activity and metabolic and hematological parameters in *L. obtusidens*, as possible early indicators of herbicide toxicity.

## 2. Materials and methods

Piava of both sexes were obtained from the Santa Maria Federal University (UFMS) fish farm (RS, Brazil). Fish (weight,  $12.0 \pm 1.0$  g; length,  $8.0 \pm 1.0$  cm) were acclimated in laboratory conditions for 10 days. They were kept in continuously aerated tanks (250 L) with a static system and with a natural photoperiod (12 h light–12 h dark). Throughout the experimental period, the water quality was as follows: temperature  $22 \pm 0.5$  °C, pH  $7.4 \pm 0.05$  units, dissolved oxygen  $7.2 \pm 0.2$  mg/L. Fish were fed once a day with commercial fish pellets (42% crude protein, Supra, Brazil). Feces and pellet residues were removed daily by suction. Acute toxicity assays were made in a static way for a 96-h, according to Antón et al. (1994). We chose 96 h test for this study because this studies are usually an initial step in the evaluation of the toxic characteristics of a substance. Previous experiments carried out in our laboratory were not able to obtain a lethal concentration ( $LC_{50}$ ) of glyphosate at 96 h, because all the fish survived even at the highest concentration tested (100 mg/L) and showed normal swimming and feeding

behavior. Therefore, experimental glyphosate concentrations were chosen considering that the recommended nominal concentration for use in agriculture ranges from 0.36 to 2.16 mg/L. After the acclimation, groups of 8 fish were placed in 45-L continuously aerated glass tanks and exposed for 96 h to 0 (control), 3, 6, 10, or 20 mg/L of Roundup (48% acid equivalent, Monsanto, St Louis, MO). All tests were carried out in triplicate and fish did not receive food during the experimental period. The herbicide was added to the water only at the beginning of the experiment. Water quality did not change throughout the experimental period.

At the end of the exposure period (96 h), all fish were sampled and blood was collected from the caudal vein with a 1-ml heparinized syringe. Total blood was used for determination of the hematocrit, hemoglobin, total erythrocyte, and leucocyte counts according to Barcellos et al. (2004). One blood aliquot was centrifuged (10 min, 1500g) for protein determination according to Lowry et al. (1951). Tissues (brain, liver, and muscle) were removed and placed on ice, frozen in liquid nitrogen, and then stored at  $-20$  °C. Liver and muscle glycogen were determined according to Bidinotto et al. (1997). Tissue protein was estimated according to Lowry et al. (1951). Tissue samples were homogenized with 10% trichloroacetic acid using a motor-driven Teflon pestle and centrifuged at 1000g for 10 min. Deproteinized supernatant was used for the determination of lactate (Harrower and Brown, 1972), sugar reducer (Park and Johnson, 1949), and total ammonia (Boyd and Tucker, 1992). AChE (EC 3.1.1.7) activities were assayed as described by Ellman et al. (1961) and modified by Villescas et al. (1981). A suitable amount (50–100  $\mu$ l) of homogenate was incubated at 25 °C for 2 min with 0.8 mM acetylthiocholine as substrate and 1.0 mM 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) as chromogen. Protein content was determined according to Bradford (1976). Enzyme activity is expressed as  $\mu$ mol of acetylthiocholine hydrolyzed per min per gram of protein.

One-way analysis of variance (ANOVA) and Duncan's multiple range tests were used. Data ( $n = 3$ ) were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD) and mean differences were considered significant at  $P < 0.05$ .

## 3. Results and discussion

The brain of unexposed control fish showed higher AChE activity than the muscle (13.8 against 6.1  $\mu$ mol/min/g of protein, respectively). AChE activity in the brain of fish exposed to glyphosate was lower than that in the control group (reduction of activity ranging from 17% in 3.0 mg/L up to 42% in 20 mg/L). However, exposure to glyphosate did not provoke significant alterations of AChE activity in the muscle (Fig. 1). Brain



AChE inhibition was also observed in European eels (*Anguilla anguilla*) exposed to diazinon (0.042 mg/L inhibition higher than 75%) (Cerón et al., 1996), and *Lepomis macrochirus* exposed to endosulfan (0.001 mg/L for 96 h, inhibition of 16%) (Dutta and Arends, 2003). Considering that in our study LC<sub>50</sub> was not obtained because all the piavas survived even at the highest concentration tested (100 mg/L), the glyphosate formulation used seems less toxic to brain AChE activity than diazinon and endosulfan. Sancho et al. (2000) indicated that AChE activity in brain of *A. anguilla* after molinate exposure decrease range, from 16% to 31% as time of exposure increases. AChE activity is frequently used as an indicator of herbicide toxicity and this enzyme is extremely important for many physiological functions. When AChE activity decreases, as in this study, Ach is

not broken and accumulates within synapses, causing physiologic impairments, such as movement disturbances, lethargy, and alterations in swimming behavior, which have also been seen in other fish species exposed to atrazine (Saglio and Trijasse, 1998), molinate (Sancho et al., 2000) and diuron (Bretaud et al., 2000). The brain AChE reduction seen in our study may be attributed to the surfactant polyethoxylated tallow amine (POEA), rather than to glyphosate itself. According to Giesy et al. (2000), the LC50 values(mg/L) for rainbow trout are between 8.2 and 27 for Roundup, between 0.65 and 7.4 for POEA, and between 140 and 240 for glyphosate alone, showing that the POEA used in the glyphosate formulation is the most toxic component of the herbicide Roundup.

The liver, which is the main detoxifying tissue, reacts primarily after stress caused by the toxicant (Sancho et al., 1998). In this study piava exposed to Roundup exhibited a significant increase in glycogen and glucose levels in the hepatic tissue, when compared to control levels. A significant reduction of liver proteins and lactate, after exposure to glyphosate, was also observed (Table 1). The muscle tissue exhibited a significant decrease of glycogen and glucose and an increase of protein and lactate levels at all glyphosate concentrations tested when compared to control levels (Table 1). A decrease in muscle glycogen in this study may indicate that stress caused by the herbicide is accompanied by a rapid degradation of muscle glycogen. The elevation of lactate also indicated metabolic disorders and a clear response against energy depletion. Sancho et al. (1998) observed the same response when European eels were exposed to fenitrothion. Glycogen reduction in liver and muscle after toxic stress have been reported by several studies (Aguar et al., 2004; Ghosh, 1987; Sancho et al., 1998; Shobha et al., 1989). However, the response patterns seem to be specific. Muscular glycogen

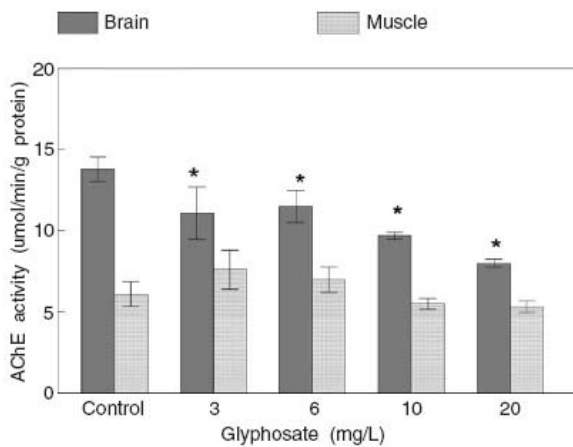


Fig. 1. AChE activity in the brain and muscle of piava (*Leporinus obtusidens*) exposed to Roundup (96 h). Values are means  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). Data are expressed as  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  protein (\* $P < 0.05$ ).

Table 1  
Hepatic and white muscle metabolites of *Leporinus obtusidens* exposed to different concentrations of Roundup for 96 h

	Control	3	6	10	20
<i>Hepatic tissue</i>					
Lactate	4.90 $\pm$ 0.04	4.2 $\pm$ 0.1*	4.3 $\pm$ 0.06*	3.61 $\pm$ 0.2*	3.81 $\pm$ 0.1*
Glycogen	57 $\pm$ 1.6	34 $\pm$ 0.3*	30 $\pm$ 0.3*	25.5 $\pm$ 0.5*	26.4 $\pm$ 0.6*
Ammonia	0.06 $\pm$ 0.003	0.07 $\pm$ 0.003*	0.07 $\pm$ 0.005*	0.075 $\pm$ 0.006*	0.13 $\pm$ 0.001*
Protein	164.4 $\pm$ 7.3	117 $\pm$ 11.6*	101.8 $\pm$ 4.8*	111.9 $\pm$ 6.8*	105.7 $\pm$ 1.2*
Glucose	9.88 $\pm$ 0.9	10.6 $\pm$ 1.1*	10.5 $\pm$ 0.07*	10.2 $\pm$ 0.7*	12.79 $\pm$ 0.7*
<i>White muscle</i>					
Lactate	11.2 $\pm$ 0.7	16.9 $\pm$ 0.04*	14.6 $\pm$ 0.9*	14.8 $\pm$ 2.7*	16.70 $\pm$ 0.2*
Glycogen	2.08 $\pm$ 0.5	1.26 $\pm$ 0.2*	1.59 $\pm$ 0.2*	1.70 $\pm$ 0.2*	1.72 $\pm$ 0.2*
Ammonia	0.15 $\pm$ 0.007	0.22 $\pm$ 0.007*	0.2 $\pm$ 0.01*	0.18 $\pm$ 0.001*	0.25 $\pm$ 0.004*
Protein	99.0 $\pm$ 5.7	108 $\pm$ 2.9*	106 $\pm$ 21.1*	115 $\pm$ 3.01*	151 $\pm$ 38.2*
Glucose	0.98 $\pm$ 0.2	0.38 $\pm$ 0.06*	0.7 $\pm$ 0.05*	0.4 $\pm$ 0.09*	0.42 $\pm$ 0.01*

Note: Glycogen, glucose and lactate were expressed in  $\mu\text{mol}/\text{g}$  tissue. Ammonia was expressed in  $\mu\text{g}/\text{mg}$  tissue and protein in  $\text{mg}/\text{g}$  tissue. Data represent the mean  $\pm$  SD, ( $n = 3$ ).

\*Indicates difference between groups and control values ( $P < 0.05$ ).

Table 2  
Hematological parameters of *Leporinus obtusidens* after Roundup exposure (96 h)

	Herbicides concentrations (mg/L)				
	Control	3	6	10	20
Hematocrit (%)	26.3 ± 2.02	23.6 ± 0.50*	24.0 ± 0.44*	23.9 ± 0.53*	24.3 ± 0.64*
Protein (mg/mL plasma)	50.27 ± 1.46	35.82 ± 0.35*	26.87 ± 0.88*	46.15 ± 0.71*	36.80 ± 0.45*
Hemoglobin (g/dL)	10.23 ± 0.46	8.78 ± 0.32*	9.31 ± 0.55*	9.83 ± 0.32*	9.81 ± 0.33*
Erythrocytes ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	1.97 ± 0.04	1.70 ± 0.02*	1.85 ± 0.06*	1.87 ± 0.04*	1.77 ± 0.05*
Leukocytes ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	127.5 ± 1.30	125.5 ± 3.31	124.3 ± 1.13	126.3 ± 1.00	125.6 ± 1.52

Note: Data represent the mean ± SD ( $n = 3$ ).

\*Indicates difference between groups and control values ( $P < 0.05$ ).

decreases in *Clarias batrachus* exposed to the organophosphate rogor (Begum and Vijayaraghavan, 1999), but no changes are observed in the liver glycogen store of *A. anguilla* exposed to fenitrothion (1/10 LC<sub>50</sub>) (Sancho et al., 1997).

Ammonia levels increased in the liver and muscle at all Roundup concentrations tested in relation to the control (Table 1). Similar results were reported by Begum (2004), in which ammonia content was increased in the liver and muscle of *C. batrachus* during carbamate exposure. The elevated ammonia concentration might be due to increased of protein catabolism of these tissues. Ammonia is a toxic metabolite and excess ammonia is known to trigger the operation of detoxification or utilization systems, chiefly by way of formation of less toxic nitrogenous substances (Begum, 2004). Plasma protein was reduced at all concentrations tested in piava (Table 2) and may indicate a compensatory response to herbicide toxicity. Those results are in agreement with tissues ammonia increase after glyphosate exposure. High energy demand might have led to the stimulation of protein catabolism (Sancho et al., 1998). Protein reduction has been observed by other authors in fish tissues after their exposure to toxicants (Sancho et al., 1998, 2000). Some authors also correlated a generalized hypoproteinemia in fish after toxicant stress with a disturbance in osmoregulation (Gluth and Hanke, 1984). Hematological values alterations observed in the present study (Table 2) are similar to those results reported by Sancho et al. (2000) in *A. anguilla* exposed to the pesticide molinate. The observed effects of these parameters and the blood protein loss may reflect a hemorrhagic anemic state after glyphosate exposure. An anemic condition is generally indicated by lowered hematocrit, erythrocyte and hemoglobin content (Sancho et al., 2000). The present study reveals that exposure of *L. obtusidens* to Roundup, glyphosate 48% (acid equivalent) produced a significant decrease in AChE activity in the brain and in some metabolic and hematological parameters. These responses may be useful as early indicators of toxicity by glyphosate in the tissues of piava.

## References

- 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.
- 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.
- Andrian, I.deF., Dória, C.daC., 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 (supl. 3), 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., 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., 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.
- Boyd, C.E., Tucker, C.S., 1992. Water quality and pond soil analyses for aquaculture. Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University.
- 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.
- Bretau, 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 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 hexagon and sumidon on behavior and some aspects of carbohydrate metabolism in fish *Cyprinus carpio*. *Uttar Pradesh J. Zool.* 7, 48–62.
- Giesy, J.P., Dobson, S., Solomon, K.R., 2000. Ecotoxicological risk assessment for roundup herbicide. *Rev. 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.
- Gluth, K., Hanke, W., 1984. A comparison of physiological changes in carp, *Cyprinus carpio*, induced by several pollutants at sub-lethal concentration. The dependence on the temperature. *Comp. Biochem. Physiol.* 796, 39–45.
- 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*). *ScienceAsia* 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.
- 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.
- 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., 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.
- Villescas, R., Oswald, R., Marimoto, H., 1981. Effects of neonatal undernutrition and cold stress on behavior and biochemical brain parameters in rats. *J. Nutr.* 111, 1103–1110.
- 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.

4.2 Avaliação de parâmetros oxidativos após exposição aguda de piavas (*Leporinus obtusidens*) a uma formulação comercial do herbicida glyphosate.

4.2.1 Manuscrito

**Acute exposure to glyphosate herbicide affects oxidative parameters in piava (*Leporinus obtusidens*)**

**Lissandra Gluszczak, Vânia Lúcia Loro\*, Bibiana Silveira Moraes, Alice Raabe, Marta Frescura Duarte, Alexandra Pretto, Milene Braga da Fonseca and Charlene Cavalheiro de Menezes**

Acute exposure to glyphosate herbicide affects oxidative parameters in piava  
(*Leporinus obtusidens*)

Lissandra Gluszczak, Vânia Lúcia Loro\*, Bibiana Silveira Moraes, Alice Raabe,  
Marta Frescura Duarte, Alexandra Pretto, Milene Braga da Fonseca and Charlene  
Cavalheiro de Menezes

Laboratório de Bioquímica Adaptativa, Departamento de Química, Universidade  
Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

Corresponding Author:

(\*) Dr<sup>a</sup> Vania Lucia Loro

Departamento de Química

Universidade Federal de Santa Maria

97105.900 - Santa Maria, RS, Brazil

Phone: 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)

## Abstract

In recent years, the commercial formulations of glyphosate herbicide have been widely used in agriculture for controlling aquatic weeds. The pesticides may produce a disruption in the ecological balance causing damage to non-target organisms including fish (Oruç and Üner, 1999; Bretaud *et al.*, 2000). Teleostean fish (*Leporinus obtusidens*) were exposed to commercial formulation glyphosate herbicide: 0 (control), 3, 6, 10 or 20 mg/L for 96 h. The effects of herbicide on plasmatic metabolic parameters, TBARS, catalase activity, protein carbonyl and mucus layer parameters were studied. Plasmatic glucose and lactate levels increase but protein levels showed reduction after herbicide exposure. TBARS levels in brain showed a reduction at all concentrations tested. However, liver demonstrated TBARS increase levels at all concentrations and in white muscle TBARS production did not change after exposure to herbicide. Fish exposed to all concentrations of glyphosate showed an increase in liver catalase activity and protein carbonyl. Herbicide exposure increase protein and carbohydrate levels of the mucus layer at all concentrations tested. The present results showed that in 96 h, glyphosate changed toxicological parameters analyzed in piava. These parameters measured in this study may be useful in environmental biomonitoring.

Keywords: glyphosate, oxidative stress, plasmatic metabolic, mucus, piava.

## 1. Introduction

The increased use of herbicides in agriculture can affect aquatic ecosystems and cause an ecological imbalance. In aquatic toxicology studies, fish are important indicators of the effects of toxic compounds. The commercial formulation glyphosate, which is the acid equivalent of the isopropylamine salt of glyphosate, contains in its formulation the polyethoxylated tallow amine (POEA) as its predominant surfactant (Jiraungkoorskul et al., 2002). This surfactant (POEA) is more acutely toxic than the active ingredient itself (Giesy et al., 2000). This herbicide is non-selective and has been used for controlling aquatic weeds (Abdullah et al., 1995; Jiraungkoorskul et al., 2002). Glyphosate does not bioaccumulate in terrestrial or aquatic animals and presents low toxicity. The glyphosate formulation rapidly dissipates in surface waters and soil microflora biodegrade it into AMPA and CO<sub>2</sub>. It is widely used in the world due to its high efficiency and cost effectiveness (Giesy et al., 2000; Tomlin, 2000).

The effect of herbicides used in agriculture on native fish species in Southern region of Brazil is little studied. The response of some aquatic organisms to environmental contaminants has been studied through the measurement of general physiological parameters such as glucose, lactate and protein (Gimeno et al., 1995; Sancho et al., 2000).

It is known that contaminants such as pesticides may induce the formation of reactive oxygen species (ROS) resulting in an imbalance between pro-oxidant and antioxidant defense mechanisms. Lipid peroxidation (LPO) induced by pollutants such as pesticides have been observed in fish species (Schlenk et al., 1997; Üner et al., 2005, 2006). Reactive oxygen species (ROS) produced in biological systems is

detoxified by antioxidant defenses. Variations in the activities of antioxidant enzymes such as catalase have been proposed as indicators of pollutant mediated oxidative stress (Ahmad et al., 2000; Sayeed et al., 2003; Üner et al., 2005). It has been established in mammals that protein damage or chemical modification of its amino acids during the oxidative stress process can produce high levels of protein carbonyls (Parvez and Raisuddin, 2005). Many studies have suggested that the protein carbonyl content may be used as a complementary biomarker of oxidative stress in humans and other vertebrates (Pey et al., 2003). However, few studies in fish have been reported (Almroth et al., 2005; Parvez and Raisuddin, 2005). The mucus layer that covers exposed surfaces of fish is important not only for its effective role as a protective barrier, but is also a hydrodynamic lubricant, as well as an active anti-parasitic and anti-bacterial agent (Tromeur et al., 1992; Sabóia-Moraes et al., 1996).

Considering that there is no information available on the changes in plasmatic metabolic, oxidative stress and mucus layer parameters in piava exposed to herbicides, the present study aimed to investigate the effects of the commercial formulation glyphosate on the oxidative stress parameters in piava (*Leporinus obtusidens*) as a complementary study concerning the toxicity of this herbicide.

## **2. Materials and methods**

The piava (*Leporinus obtusidens*) species was chosen for this study because it is a native freshwater fish of Southern Brazil with good acceptance in the consumer market (Andrian et al., 1994; Baldisserotto et al., 2005). Piava of both sexes were obtained from the Santa Maria Federal University (UFSM) fish farm (RS- Brazil). Fish (weight,  $12.0 \pm$



1.0 g; length,  $8.0 \pm 1.0$  cm) were acclimated to laboratory conditions for 10 days. They were kept in continuously aerated tanks (250 L) with a static system and with a natural photoperiod (12 h light -12 h dark). Throughout the experimental period, the water quality was as follows: temperature  $23 \pm 0.5$  °C, pH  $7.5 \pm 0.05$  units, dissolved oxygen  $7.1 \pm 0.2$  mg/L. Fish were fed once a day with commercial fish pellets (42% crude protein, Supra, Brazil). Feces and pellet residues were removed daily by suction. Acute toxicity assays were made in a static way for 96 h, according to Ánton et al. (1994). Previous experiments carried out in our laboratory were not able to obtain a lethal concentration ( $LC_{50}$ ) of glyphosate at 96 h, because all the fish survived even at the highest concentration tested (100 mg/L) and showed normal swimming and feeding behavior. Therefore, experimental glyphosate concentrations were chosen considering the nominal sub-lethal concentrations. This study was approved by the Ethics and Animal Welfare Committee of the Federal University of Santa Maria (nº 23081.016049/2005-40). After the acclimation, groups of 8 fish were placed in 45 L continuously aerated glass tanks and exposed for 96 h to: 0 (control), 3, 6, 10 or 20 mg/L of commercial formulation glyphosate (480 g/L acid equivalent, 692 g/L inert ingredients, Monsanto Company, St Louis MO, USA). All tests were carried out in triplicate. The herbicide was added to the water only at the beginning of the experiment. Water quality did not change throughout the experimental period.

At the end of the exposure period (96 h), the mucus was carefully scraped from dorsal body surface (total area  $6 \text{ cm}^2$ ) using a cotton-tipped swab. After scraping, the cotton was immersed in 2 mL of distilled water, and the sample was used to determine soluble sugar (Dubois et al., 1956) and protein (Lowry et al., 1951). All fish were

sampled and blood was collected from the caudal vein with a 1 mL heparinized syringe. One blood aliquot was centrifuged at 1500 X *g* for 10 min and plasma was separated. Plasma glucose was measured by the glucose oxidase method with Bioclin test kit. Plasma was dissolved in 10% trichloroacetic acid (1:20 dilution) and lactate was estimated according to Harrower and Brown (1972). Plasma total protein levels were measured according to Lowry et al. (1951) using bovine serum albumin (Sigma) as standard. Brain, white muscle and liver samples were quickly removed, washed with 150 mM saline solution, packed in Teflon tubes and kept at -20°C for posterior analyses.

### *2.1. TBARS determination*

Lipid peroxides produced from oxidative stress was quantified by a TBARS assay; this is performed by a malondialdehyde (MDA) reaction with 2-thiobarbituric acid (TBA), which is optically measured. Tissues samples (brain, white muscle and liver) were homogenized in a Potter-Elvehjem glass/Teflon homogenizer with 20 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4 (with 0.1% Triton X100 and 150 mM NaCl) (1:20 dilution), centrifuged at 10000 X *g* for 10 min at 4°C. Brain, white muscle and liver homogenates (100-400 µl) were added to 8.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 2.5 M acetic acid (pH 3.4), 0.8% thiobarbituric acid were added to adjust to a final volume of 2.0 mL. The reaction mixture was placed in a microcentrifuge tube and incubated for 90 min at 95°C. After cooling, it was centrifuged at 5000 X *g* for 10 min and the optical density at 532 nm was determined. TBARS levels are expressed as nmols MDA mg/L of protein according to Ohkawa et al. (1979).

## *2.2. Catalase activity assay*

Catalase (EC 1.11.1.6) activity was assayed by ultraviolet spectrophotometry (Nelson and Kiesov, 1972). Liver samples were prepared as reported for TBARS assay. Briefly, the assay mixture consisted of 2.0 mL potassium phosphate buffer (50mM, pH 7.0), 0.05 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.3 M) and 0.05 mL homogenate. Catalase (CAT) activity was determined by following the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decrease in 240 nm of absorbance. The enzyme activity was expressed as micromoles of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduced per milligram of protein per minute ( $\mu\text{mol}/\text{mg protein}/\text{min}$ ).

## *2.3. Carbonyl protein determination*

The liver tissue was homogenized in 10 volumes (w/v) of 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 using a glass homogenizer. The protein carbonyl content was determined by the method described by Yan et al. (1995), with some modifications. Briefly, homogenates were diluted to 0.7 – 0.8 mg/mL of protein in each sample, and 1 mL aliquots were mixed with 0.2 mL of 2,4-dinitrophenylhydrazine (10 mM DNPH) or 0.2 mL HCl 2M . After incubation at room temperature for 1 hour in dark, 0.5 mL of denaturing buffer (150 mM sodium phosphate buffer, pH 6.8, containing SDS 3%), 2.0 mL of heptane (99.5%) and 2.0 mL of ethanol (99.8%) were added sequentially, vortexed agitation for 40s and centrifuged for 15 min. Next, the protein isolated from the interface was washed two times with 1 mL of ethyl acetate:ethanol 1:1 (v/v), and suspended in 1mL of denaturing buffer. Each DNPH sample was read at 370 nm in Femto Scan spectrophotometer

against the corresponding sample (blank), and total carbonylation calculated using a molar extinction coefficient of  $22000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

#### *2.4. Protein determination*

Protein levels for oxidative stress parameters were spectrophotometrically estimated by the method of Bradford (1976), using bovine serum albumin as standard.

#### *2.5. Statistical Analysis*

One-way analysis of variance (ANOVA) and Duncan's multiple range tests were used. Data ( $n=3$ ), that represent the mean of each triplicate (8); were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD) and mean differences were considered significant at  $P < 0.05$ .

### **3. Results and discussion**

Plasma glucose and lactate levels increased after exposure to glyphosate (Table 2). The hyperglycemia present in fish exposed to the herbicide may partially be a consequence of brain cholinesterase inhibition shown in this fish species (Gluszczak et al., 2006). The blockage of the neuroeffector in the adrenal medulla favors the glycogen breakdown and glucose export due to the hypersecretion of adrenaline (Aguiar et al., 2004; Crestani et al., 2006). The changes in lactate levels also indicate metabolic disorders. Lactate has been widely used as a measure of anaerobic metabolism, and

this increase has been demonstrated to be a rapid and clear response against the depletion of energy caused by a lack of oxygen (Gimeno et al., 1995). Decreased plasma protein in *Leporinus obtusidens* at all concentrations tested may indicate the use of plasmatic protein to supply energy metabolism disrupting of any tissue. In addition, these results may indicate a physiological adaptability of fish to compensate for oxidative damage caused by this herbicide. Hypoproteinemia is usually associated with fish exposure to pesticide and has been correlated with a disturbance in osmorregulation (Sancho et al., 2000; Begum, 2004).

The measurement of lipid peroxidation through the quantification of TBARS has been used as an indicator of oxidative stress in fish. In this work, TBARS levels were altered after fish exposure to glyphosate. TBARS levels in the brain tissue showed a reduction at all concentrations tested when compared with the control group ( $P < 0.05$ ). Similar results were observed in our laboratory (unpublished data) concerning brain TBARS levels where *L. obtusidens* exposed to clomazone (0.5 mg/L) or propanil herbicides (3.6 mg/L) showed a decrease in TBARS levels in this tissue. Hepatic tissues showed an increase in TBARS levels at all concentrations tested. In the liver, an elevation in TBARS suggests the participation of free-radical induced oxidative cell injury caused by glyphosate toxicity. In muscle tissues, the TBARS production did not change at any concentration tested (Fig. 1). Apparently, glyphosate caused lipid peroxidation only in liver tissues and changes in TBARS varied depending on the tissue considered.

As in this study, *Leporinus obtusidens* exposed to herbicides clomazone (0.5 mg/L) or propanil (3.6 mg/L) exhibited a TBARS increase in the liver (Moraes et al., 2007). The level of lipid peroxidation may differ among the fish species and tissues considered. For example, TBARS levels in *Leporinus obtusidens* poisoned with

herbicides at rice field conditions showed reduced TBARS levels observed in white muscle after exposure to herbicides quinclorac (0.375 mg/L), propanil (3.6 mg/L) and metsulfuron methyl (0.002 mg/L). However, another fish species, *Rhamdia quelen*, exposed to clomazone (0.5 or 1.0 mg/L) showed an increase in TBARS levels, particularly in the liver, after 12, 24, 48, 96 or 192 h of exposure (Crestani et al., 2007). Li et al. (2003) also observed elevated TBARS levels in the liver of *Carassius auratus* after exposure of 3,4-Dichloroaniline. The differences in peroxide levels have also been attributed to the variation in antioxidant mechanisms of fish species (Radi et al., 1985; Ahmad et al., 2000).

The antioxidant enzyme catalase showed an increase in activity in the liver with the increase in the herbicide concentration (Fig. 2). This enzyme seems to be important as an antioxidant defense against possible lipid damage generated by glyphosate. Catalase activity showed an increase in the hepatic tissue after exposure to herbicide (Fig. 2). According to previous experiments (Moraes et al., 2007), an elevation in catalase activity was observed in the liver of *Leporinus obtusidens* exposed to commercial formulations herbicides clomazone (0.5 mg/L) or propanil (3.6 mg/L). However, Crestani et al. (2006), showed a reduction in catalase activity in the hepatic tissue of silver catfish exposed to clomazone (0.5 or 1.0 mg/L) after 12, 24 and 96 h. Sayeed et al. (2003), also observed a decrease of 45% in hepatic catalase activity as well as high levels of TBARS in freshwater fish (*Channa punctatus*) exposed to the insecticide deltamethrin. Thus, oxidative stress generated by water containing glyphosate-based herbicides may suppress the antioxidant defense represented by catalase and consequently a loss of this compensatory mechanism.

Fish exposed to glyphosate concentrations showed an increase in protein carbonyls in the liver tissue (Fig. 3). Parvez and Raisuddin (2005) also observed an increase in protein carbonyls after 48 h of exposure to deltamethrin, endosulfan or paraquat. Few studies have been carried out using protein carbonyl formation in teleost fish. The presence of carbonyl groups in protein has been used as a marker of ROS mediated protein oxidation (Madhusudhanan et al., 2004; Parvez and Raisuddin, 2005). The reduction of TBARS formation shown in our study may affect protein oxidation. In addition, this increase in protein carbonyl levels would indicate that the normal protein metabolism is disrupted, resulting in an accumulation of damaged molecules. The relationship between TBARS, catalase activity and protein carbonylation in this study may indicate a response of the fish to survive after herbicide toxicity.

In this study, *Leporinus obtusidens* exposed to glyphosate showed an increase in protein and carbohydrate levels and of the mucus layer when compared to the controls (Table 1). Glycoproteins represent the major component of the mucus coating the fish skin. The changes in carbohydrate and protein content in the fish surface observed in *L. obtusidens* could be a mechanism to protect against external agents and microbial development. The suggested functional significance of the fish epidermal mucus includes osmorregulation, protection from abrasions, entanglement of particulate materials, defense against pathogens and parasites, reduction of swimming drag or friction and protection against environmental contaminants (Tromeur et al., 1992; Hinton, 2001). In this context our results can represent a protective mechanism against glyphosate toxicity.

In summary, the present work demonstrated that the glyphosate-based herbicide concentrations used in agricultural fields cause changes in the oxidative stress

parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). It is evident that, from an eco-physiological point of view, the use of this herbicide formulation in the agriculture and aquaculture must be carefully evaluated. In conclusion, the health of this fish species may be affected by the presence of glyphosate in the water and the alterations of the parameters analyzed could be used to monitor herbicide toxicity in *Leporinus obtusidens*.



## References

- Abdullah, P.M., Daud, J., Hong, S.K., Yew, H.C., 1995. Improved method for the determination of glyphosate in water. *J. Chromatogr. A* 697, 363-369.
- 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.
- 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. *Biochim. Biophys. Acta* 1523, 37-48.
- Almroth, C. B., Sturve, J., Berglund, A., Förlin, L., 2005. Oxidative damage in eelpout (*Zoarces viviparus*), measured as protein carbonyls and TBARS, as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 73, 171-180.
- 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 (3), 97-106.
- Antón, F.A , Laborda, E., Ariz, M., 1994. Acute toxicity of the herbicide glyphosate to fish. *Chemosphere* 28, 745-753.
- Baldisserotto, B. ; Gomes, C. L., 2005. Espécies nativas para piscicultura no Brasil. In Tataje, R. D., Filho, Z. E. (Eds.), *Cultivo do gênero *Leporinus**, Editora UFSM, Santa Maria - RS Brasil, pp. 81-103.

- 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.
- Bradford, M.M., 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.
- Bretau, S.; Toutant, J.P.; Saglio, P. 2000. Effects of carbofuran, diuron, and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicol. Environ. Safety* 47, 117-124.
- Crestani, M., Menezes, C., Gluszczak, L., Miron, dos S. D., Lazzari, R., Duarte, F. M., Morsch, M. V., Pippi, L. A., Vieira, P. V., 2006. Effects of clomazone herbicide on hematological and some parameters of protein and carbohydrate metabolism of silver catfish *Rhamdia quelen*. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 65, 48-55.
- Crestani, M., Menezes, C., Gluszczak, L., Miron, dos S.D., Spanevello, R., Silveira, A., Gonçalves, F.F., Zanella, R., Loro, L.V., 2007. Effect of clomazone herbicide on biochemical and histological aspects of silver catfish (*Rhamdia quelen*) and recovery pattern. *Chemosphere* 67, 2305-2311.
- Dubois, M.G., Gilles, K.A, Hamilton, J.K., Roberts, P.A, Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350-358.
- Giesy, J.P., Dobson, S., Solomon, K.R., 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide. *Rev. 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. Safety* 31, 153-157.

- Gluszczak, L., Miron, S.D., Crestani, M., Fonseca, B.M., Pedron, A.F, Duarte, F.M., Vieira, P.L.V., 2006. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity, metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Ecotoxicol. Environ. Safety* 65, 237-241.
- Harrower, J.R., Brown, C.H., 1972. Blood lactic acid. A micromethod adapted to field collection of microliter samples. *J. App. Physiol.* 32, 709-711.
- Hinton, D.E., Segner, H., Braunbeck, T. Toxic responses of the liver. In: Schlenk, D.,Benson, W.H. Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts. London,v.1, 2001.
- 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.
- Li, W., Yin, D., Zhou, Y., Hu, S., Wang, L., 2003. 3,4-Dichloroaniline-induced oxidative stress in liver of crucian carp (*Carassius auratus*). *Ecotoxicol. Environ. Safety* 56, 251-255.
- Lowry, O.H., Rosbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Madhusudhanan, N., KavithaLakshi, S.N., Radha Shanmugasundaram, K., 2004. Oxidative damage to lipids and proteins induced by aflatoxin B<sub>1</sub> in fish (*Labeo rohita*) – protective role of Amrita Bindu. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 17, 73-77.
- Moraes, S.B., Loro, L.V., Gluszczak,L., Pretto, A., Menezes, C., Marchezan, E., Machado, de O.S., 2007. Effects of four rice herbicides on some metabolic and toxicology parameters of teleost fish (*Leporinus obtusidens*). *Chemosphere* 68, 1597-1601.

- Nelson, D.P., Kiesov, L.A., 1972. Enthalphy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C (with molar extinction coefficients of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution in the UV). *Anal. Biochem.* 49, 474-478.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351-358.
- Parvez, S., Raisuddin, S., 2005. Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 20, 112-117.
- Pey, A. Saborido, A., Blázquez, I., Delgado, J., Megías, A., 2003. Effects of prolonged stanozolol treatment on antioxidant enzyme activities, oxidative stress markers, and heat shock protein HSP72 levels in rat liver. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 87, 269-277.
- Radi, A.A.R., Hai, D.Q., Matkovics, B., Gabrielak, T., 1985. Comparative antioxidant enzyme study in freshwater fish with different types of feeding behavior. *Comp. Biochem. Physiol.* 81 C, 395-399.
- Rodrigues, B.N., Almeida, F.S., 2005. *Guia de Herbicidas*, fifty ed. Londrina, PR, Brazil 648pp.
- Sabóia-Moraes, S.M.T., Hernandez-Blazquez, F.J., Mota, D.L., Bittencourt, A. M., 1996. Mucous cell types in the branchial epithelium of the euryhaline fish *Poecilia vivípara*. *J. Fish Biol.* 49, 545-548.
- Sancho, E., Fernandez-Véga, C., Sanchez, M., Ferrando, M.D., Andreu-Moliner, E., 2000. Alterations on AChE activity of the fish *Anguilla anguilla* as response to herbicide-Contaminated Water. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 46, 57-63.

- Sayeed, I., Parvez, S., Pandey, S., Bin-Hafeez, B., Rizwanul, H., Raisuddin, S., 2003. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. *Ecotoxicol. Environ. Safety*. 56, 295-301.
- Schlenk, D., Wolford, L., Chelius, M., Steevens, J., Chan, K.M., 1997. Effect of arsenite, arsenate, and the herbicide monosodium methyl arsonate (MSMA) on hepatic metallothionein expression and lipid peroxidation in *channel catfish*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 118(2), 177-183.
- Üner, N., Oruç, E., Sevgiler, Y., 2005. Oxidative stress-related and ATPase effects of etoxazole in different tissues of *Oreochromis niloticus*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 20, 99-106.
- Üner, N., Oruç, E., Sevgiler, Y., Sahin, N., Durmaz, H., Usta, D., 2006. Effects of diazinon on acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation in the brain of *Oreochromis niloticus*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 21, 241-245.
- Tomlin, C.D.S., 2000. The pesticide manual. A world compendium. 12th edition. BCPC, Surrey, UK.
- Tromeur, F., Guerard, F., Le Gal, Y., 1992. Mucous glycoproteins from the ray *Raja batis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 102B, 773-778.
- Yan, L.J., Traber, M.G., Packer, L., 1995. Spectrophotometric method for determination of carbonyls in oxidatively modified apolipoprotein B of human low-density lipoproteins. *Anal. Biochem.* 228, 349–351.

## FIGURE CAPTIONS

Fig.1. TBARS levels (nmol MDA/mg protein) in brain, liver and white muscle of *Leporinus obtusidens* exposed to glyphosate for 96 h. Data represent the mean  $\pm$  SD (n=3). \* Indicates difference between groups and control values (P<0.05).

Fig.2. Catalase activity ( $\mu$ mol/mg protein/min) in liver of *Leporinus obtusidens* exposed to glyphosate (96h). Data are reported as mean  $\pm$  SD (n=3). \* Indicates significant difference from control (P< 0.05).

Fig.3. Protein carbonyl (nmol carbonyl/mg protein) in liver of *Leporinus obtusidens* exposed to glyphosate for 96 h. Data are reported as mean  $\pm$  SD (n=3). \* Indicates significant difference from control (P< 0.05).

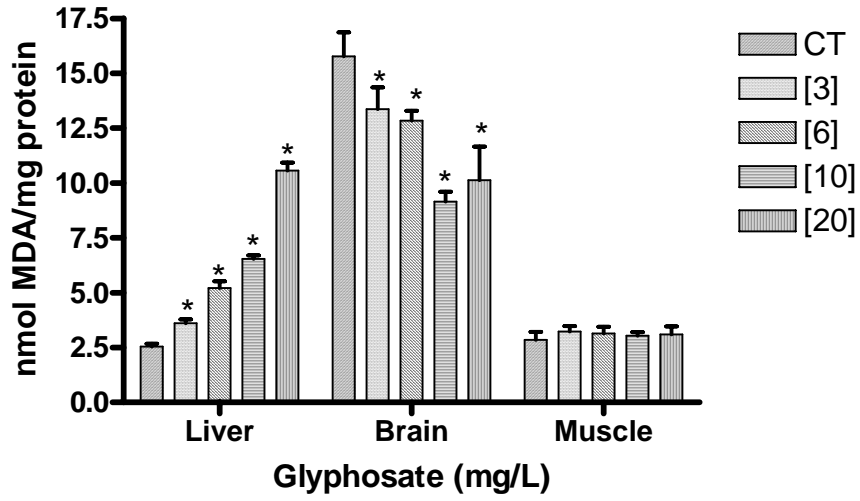


Fig. 1

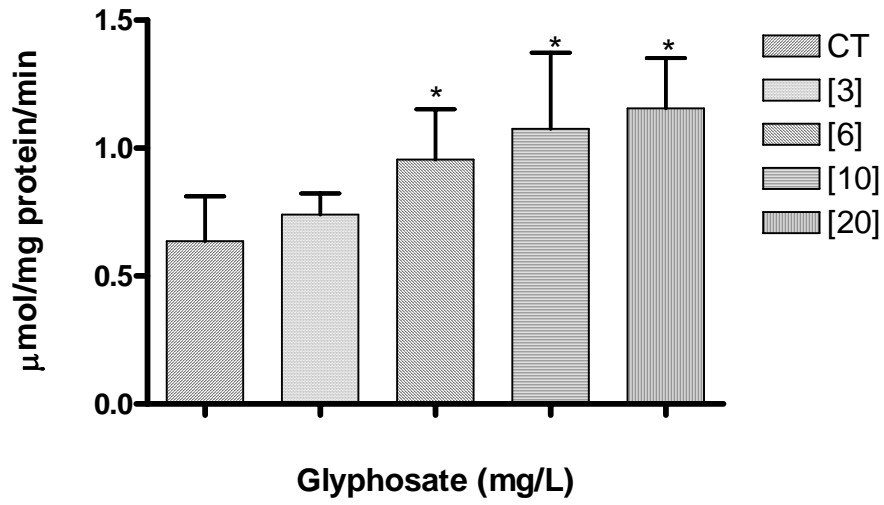


Fig. 2



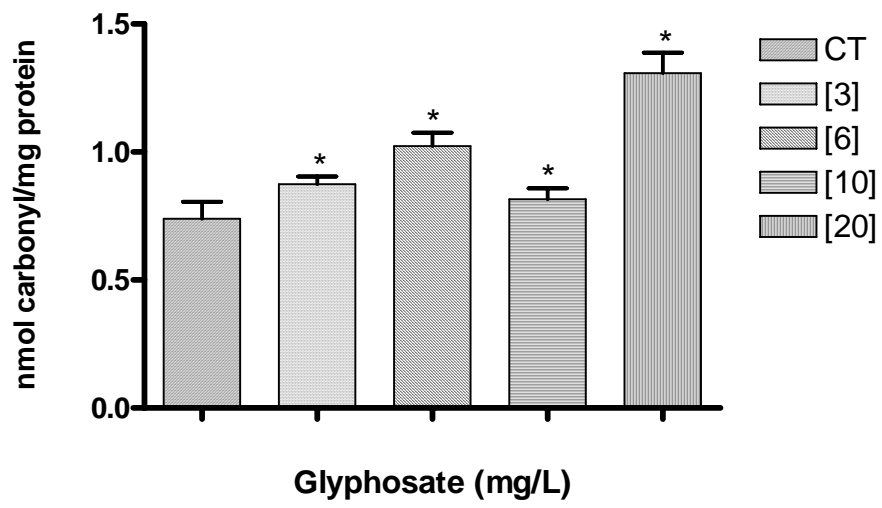


Fig. 3

**Table 1.** Protein and glucose levels of the mucus layer of *Leporinus obtusidens* after glyphosate exposure (96 h). Data represent the mean  $\pm$  SD, (n=3). \* Indicates significant difference from control (P< 0.05).

Mucus layer	Glyphosate (mg/L)				
	Control	3	6	10	20
Protein ( $\mu\text{g protein cm}^2$ )	0.018 $\pm$ 0.002	0.025 $\pm$ 0.001*	0.046 $\pm$ 0.001*	0.051 $\pm$ 0.001*	0.053 $\pm$ 0.001*
Glucose ( $\mu\text{g sugar cm}^2$ )	0.011 $\pm$ 0.0006	0.020 $\pm$ 0.0005*	0.023 $\pm$ 0.0008*	0.022 $\pm$ 0.0007*	0.033 $\pm$ 0.0001*

**Table 2.** Plasma metabolic parameters in *Leporinus obtusidens* after glyphosate exposure (96 h). Data represent the mean  $\pm$  SD, (n=3). \* Indicates significant difference from control (P< 0.05).

Plasma	Glyphosate (mg/L)				
	Control	3	6	10	20
Protein (mg/mL)	26.3 $\pm$ 2.02	23.6 $\pm$ 0.50*	24.0 $\pm$ 0.44*	23.9 $\pm$ 0.53*	24.3 $\pm$ 0.64*
Glucose (mg/dL)	32.0 $\pm$ 5.90	45.5 $\pm$ 0.54*	40.5 $\pm$ 1.36*	41.3 $\pm$ 1.36*	39.3 $\pm$ 1.36*
Lactate ( $\mu\text{mol/mL}$ )	2.67 $\pm$ 0.07	3.05 $\pm$ 0.14*	3.09 $\pm$ 0.23*	3.24 $\pm$ 0.14*	3.55 $\pm$ 0.34*

4.3 Efeito de uma formulação comercial do herbicida glyphosate após exposição aguda de jundiás (*Rhamdia quelen*).

4.3.1 Artigo II

**Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*)**

**Lissandra Gluszczak, Denise dos Santos Miron, Bibiana Silveira Moraes, Róli Rodrigues Simões, Maria Rosa Chitolina Schetinger, Vera Maria Morsch, Vânia Lúcia Loro**

**Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 146: 519 - 524, 2007**



## Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*)

Lissandra Glusczak, Denise dos Santos Miron, Bibiana Silveira Moraes, Róli Rodrigues Simões, Maria Rosa Chitolina Schetinger, Vera Maria Morsch, Vânia Lucia Loro\*

*Laboratório de Bioquímica Adaptativa, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil*

Received 28 June 2006; received in revised form 7 June 2007; accepted 12 June 2007  
Available online 19 June 2007

### Abstract

Silver catfish (*Rhamdia quelen*; Teleostei) were exposed to commercial formulation Roundup®, a glyphosate herbicide: 0 (control), 0.2 or 0.4 mg/L for 96 h. Fish exposed to glyphosate showed an increase in hepatic glycogen, but a reduction in muscle glycogen at both concentrations tested. Glucose decreased in liver and increased in muscle of fish at both herbicide concentrations. Glyphosate exposure increased lactate levels in liver and white muscle at both concentrations. Protein levels increased in liver and decreased in white muscle while levels of ammonia in both tissues increased in fish at both glyphosate concentrations. Specific AChE activity was reduced in brain after treatments, no changes were observed in muscle tissue. Catalase activity in liver did not change during of exposure. Fish exposed to glyphosate demonstrated increased TBARS production in muscle tissue at both concentrations tested. For both glyphosate concentrations tested brain showed a reduction of TBARS after 96 h of exposure. The present results showed that in 96 h, glyphosate changed AChE activity, metabolic parameters and TBARS production. The parameters measured can be used as herbicide toxicity indicators considering environmentally relevant concentration.  
© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Glyphosate; Metabolic; Silver catfish; Catalase; TBARS; AChE

### 1. Introduction

The biological response of an aquatic organism to pollutants frequently induces changes at cellular and biochemical levels, leading to changes in the structure and function of the cells, tissues, physiology and behavior of the organism (Parvez and Raisuddin, 2005). According to Jiraungkoorskul et al. (2002), the formulation of Roundup® is isopropylamine (IPA) salt of glyphosate 480 g/L, water and polyethoxylated tallow amine surfactant, POEA. The surfactant POEA is a non-ionic substance used in herbicide formulations to increase the efficacy of active ingredients and promotes penetration of herbicide into plant cuticles (Brausch and Smith, 2007). The glyphosate formulations frequently use surfactant POEA that is more

acutely toxic than the glyphosate itself (Giesy et al., 2000). This herbicide is non-selective and has been widely used in recent years. Glyphosate formulation rapidly dissipates from surface waters and soil microflora biodegrade it into AMPA and CO<sub>2</sub>. Thus, the active ingredient persists in the water environment for only a short time (Giesy et al., 2000; Jiraungkoorskul et al., 2002). Commercial formulations of glyphosate including Rodeo®, Roundup® and Aquamaster® have been investigated for their potential to produce adverse effects in non-target organisms like fish (Gardner and Grue, 1996; Williams et al., 2000). The glyphosate concentration used in rice and soybean cultures in Southern Brazil ranges from 0.36 to 2.16 mg/L. The half-life of glyphosate in the soil is around 30 to 90 days and its water solubility is 157 µg/L (Rodrigues and Almeida, 1998).

Teleostean fish may be good indicators of contamination by pollutants such as herbicides because their biochemical responses are similar to those found in mammals (Sancho et al., 2000; Begum, 2004). The measurement of acetylcholinesterase (AChE) activity present in the cholinergic synapses and motor end plates has been used by different authors to monitor carbamate and

\* Corresponding author. Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, 97105.900 — Santa Maria, RS, Brazil. Tel.: +55 3220 9456; fax: +55 32208240.

E-mail addresses: [vanial@smail.ufsm.br](mailto:vanial@smail.ufsm.br), [vaniluc@yahoo.com.br](mailto:vaniluc@yahoo.com.br) (V.L. Loro).

organophosphate effects in insects and vertebrates, such as fish (Chuiiko, 2000; Fernández-Vega et al., 2002; Filho et al., 2004). However, brain AChE activity has been modified by pesticides of other classes, such as organochlorine endosulfan (Dutta and Arends, 2003) and isooxazolidinone clomazone (Miron et al., 2005).

Many environmental pollutants may induce the formation of reactive oxygen species (ROS) (Ahmad et al., 2000; Sevçiler et al., 2004). Due to their high reactivity, these species may cause damage to lipids, proteins, carbohydrates, or nucleic acids (Fraga et al., 1996; Parvez and Raisuddin, 2005). Pollutant-induced lipid peroxidation (LPO), as in the case of herbicides, has been observed in several fish species (Schlenk et al., 1997; Sevçiler et al., 2004). Variations in the activities of antioxidant enzymes have been proposed as indicators of pollutant mediated oxidative stress (Ahmad et al., 2000; Li et al., 2003). The silver catfish (*Rhamdia quelen*) was chosen because it is a native freshwater species of economical importance in Southern Brazil. The aim of this study was to investigate the effects of short-term formulation of glyphosate exposure on metabolic and enzymatic parameters in *R. quelen* as possible indicators of herbicide toxicity.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

The herbicide used in this study was commercial formulation Roundup® (48% (480 CE) acid equivalent Monsanto Company, St Louis MO, USA) and dissolved in water. Acetylthiocholine, 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), bovine serum albumin, Triton X-100, (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), malondialdehyde (MDA), 2-thiobarbituric acid (TBA) and sodium dodecyl sulfate (SDS) were purchased from Sigma Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

### 2.2. Fish

Juvenile silver catfish (*R. quelen*, Heptapteridae, Siluriformes) of both sexes with an average mass of 45.0±8.0 g and length of 17±1.0 cm, acquired from the Federal University of Santa Maria fish farm (UFSM), were acclimated to laboratory conditions for 10 days, in 250 L boxes, with aerated water. Water conditions were: temperature 21±2.0 °C, pH 7.6±0.2 units, dissolved oxygen 6.4±0.3 mg/L, non-ionized ammonia 0.007±0.001 mg/L, nitrite 0.03±0.01 mg/L, alkalinity 65±5.4 mg/L CaCO<sub>3</sub> and hardness 20±1.5 mg/L CaCO<sub>3</sub>. All water parameters were determined according to Boyd and Tucker (1992). During acclimation, fish were fed once a day with commercial fish pellets (42% crude protein, Supra, Brazil).

### 2.3. Experimental design

Experimental glyphosate concentrations were chosen according to Rodrigues and Almeida (1998), considering the minimum of herbicide used in rice field systems. After acclimation, groups of fish ( $n=8$ ) were placed in 45 L continuously aerated glass tanks and exposed for 96 h to: 0 (control), 0.2 or 0.4 mg/L of

Roundup® (48% acid equivalent). All tests were carried out in triplicate and fish did not receive food during the experimental period, according to Aguiar et al. (2004). The herbicide was added to the water only at the beginning of the experiment. Water quality did not change throughout the experimental period.

### 2.4. Sampling

At the end of the exposure period (96 h), all fish were sampled. Brain, liver and white muscle were removed and placed on ice, frozen in liquid nitrogen and then stored at -20 °C. Liver and muscle glycogen were determined according to Bidinotto et al. (1997). Tissue protein was estimated according to Lowry et al. (1951). Tissue samples were homogenized with 10% trichloroacetic acid using a motor-driven teflon pestle and centrifuged at 1000 ×g for 10 min. Deproteinized supernatant was used for the determination of lactate (Harrower and Brown, 1972), soluble sugar (Park and Johnson, 1949) and total ammonia (sum of ammonia and ammonium) (Boyd and Tucker, 1992). Brain, white muscle and liver samples were quickly removed, washed in 150 mM saline solution, packed in Teflon tubes and stored at -20 °C.

### 2.5. AChE activity assay

Brain and white muscle samples were weighed and homogenized in a Potter–Elvehjem glass/Teflon homogenizer with 150 mM NaCl. The homogenate was centrifuged for 15 min at 3000 ×g at 5 °C and the supernatant was used as the enzyme source. AChE (EC 3.1.1.7) activity was measured as described by Ellman et al. (1961) and modified by Miron et al. (2005). Aliquots of supernatant (50 to 100 µL) (brain and muscle respectively) were incubated at 25 °C for two min with 0.1 M phosphate buffer pH 7.5, 1 mM DTNB as chromogen. After 2 min, the reaction was initiated by the addition of acetylthiocholine (0.08 M) as substrate. The final volume was 2.0 mL. Absorbance was determined at 412 nm during 2 min. Enzyme activity was expressed as µmol of acetylthiocholine (ASCh) hydrolyzed per min per mg of protein.

### 2.6. Catalase activity assay

Catalase (EC 1.11.1.6) activity was assayed by ultraviolet spectrophotometry (Nelson and Kiesov, 1972). Samples of liver were homogenized in a Potter–Elvehjem glass/Teflon homogenizer with 20 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4 (with 0.1% Triton X100 and 150 mM NaCl) (1:20 dilution), centrifuged at 10,000 ×g for 10 min at 4 °C. Briefly, the assay mixture consisted of 2.0 mL potassium phosphate buffer (50 mM, pH 7.0), 0.05 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.3 M) and 0.05 mL homogenate. Change of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> absorbance in 60 s was measured at 240 nm. Catalase activity was calculated in terms of ΔE/min/mg protein.

### 2.7. TBARS determination

Peroxides produced from oxidative stress can be quantified by a TBARS assay. This is performed by a malondialdehyde

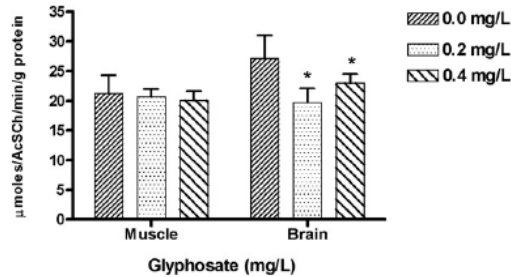


Fig. 1. AChE activity in the brain and white muscle of jundiá (*Rhamdia quelen*) exposed to Roundup® (96 h). Values are means  $\pm$  SD ( $n=8$ ). Data are expressed as  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  protein (\* $P<0.05$ ).

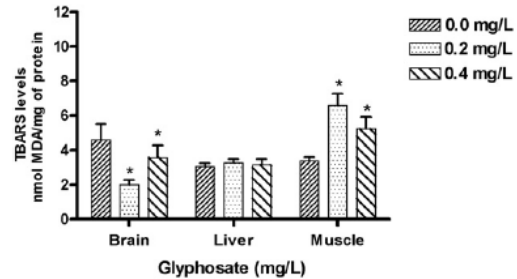


Fig. 2. TBARS levels (nmol MDA/mg of protein) in brain, liver and white muscle of *Rhamdia quelen* exposed to 0.2 and 0.4 mg/L of Roundup® for 96 h exposure. Data represent the mean  $\pm$  SD, ( $n=8$ ). \*Indicates difference between groups and control values ( $P<0.05$ ).

(MDA) reaction with 2-thiobarbituric acid (TBA), which is optically measured. Brain, white muscle and liver samples were prepared as reported for the catalase assay. Homogenates (100–400  $\mu\text{L}$ ) were added to 8.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 2.5 M acetic acid (pH 3.4), 0.8% thiobarbituric acid were added to adjust to a final volume of 2.0 mL. The reaction mixture was placed in a microcentrifuge tube and incubated for 90 min at 95 °C. After cooling, it was centrifuged at 5000  $\times g$  for 10 min and the optical density at 532 nm was determined. TBARS levels are expressed as nmols MDA per mg of protein according to Ohkawa et al. (1979). Protein levels were estimated spectrophotometrically by the method of Bradford (1976), using bovine serum albumin as standard.

### 2.8. Statistical procedures

One-way analysis of variance (ANOVA) and Duncan's multiple range tests were used. Data ( $n=8$ ) were expressed as

mean  $\pm$  standard deviation (SD) or standard error (SEM) and mean differences were considered significant at  $P<0.05$ .

### 3. Results

AChE activity in the brain of fish exposed to glyphosate (Roundup®) was lower than in the control group (reduction of activity ranging from 25–27% in both concentrations tested). However, exposure to glyphosate herbicide did not cause alterations of AChE activity in muscle (Fig. 1). In this study, silver catfish exposed to glyphosate exhibited an increased in liver glycogen, lactate, protein and ammonia levels, but decreased of glucose levels when compared to control values (Table 1). In muscle, a reduction of protein and glycogen levels was observed after exposure to the both herbicide concentrations. However, muscle content of lactate, ammonia and glucose was increase as compared to control (Table 1). TBARS levels were not altered in liver of fish exposed to glyphosate at both concentrations tested. In contrast, muscle tissue exposed to 0.2 and 0.4 mg/L of herbicide showed an increase of 56% in TBARS levels when compared with control values. Brain TBARS levels decreased significantly ranging from 53.82% (0.4 mg/L) and 93.23% (0.2 mg/L) in comparison to the control group (Fig. 2). Exposure to glyphosate did not cause any effects in liver catalase activity at either concentration tested.

### 4. Discussion

The results of our study showed that silver catfish exposed to glyphosate significantly decreased brain AChE activity at both concentrations tested (maximum inhibition 27% in the 0.2 mg/L). However, this exposure did not cause alterations of AChE activity in muscle. It is known that AChE sensitivity is variable among species with being the brain and muscle the most frequent tissues to study acetylcholine hydrolysis (Sancho et al., 2000). Our results concerning brain AChE activity are in agreement with those obtained in *Leporinus obtusidens* (piava), where exposure to glyphosate showed reduced brain AChE activity, but no significant alteration in muscle (Gluszcak et al., 2006). Another herbicide tested in silver catfish was clomazone, and, at concentrations of 5 mg/L, brain and muscle AChE activity decreased

Table 1  
Hepatic and white muscle metabolites of *Rhamdia quelen* exposed to different concentrations of glyphosate for 96 h

Metabolites	Exposure period (96 h)		
	Control	0.2 mg/L	0.4 mg/L
<i>Liver</i>			
Glucose	17.04 $\pm$ 0.37	12.24 $\pm$ 0.88 <sup>a</sup>	9.99 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>
Glycogen	82.85 $\pm$ 0.75	91.69 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	92.16 $\pm$ 0.72 <sup>a</sup>
Lactate	5.04 $\pm$ 0.34	6.20 $\pm$ 0.48 <sup>a</sup>	6.52 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup>
Protein	225.5 $\pm$ 1.15	256.3 $\pm$ 1.13 <sup>a</sup>	271.2 $\pm$ 1.12 <sup>a</sup>
Ammonia	0.06 $\pm$ 0.03	0.08 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.08 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>
<i>White muscle</i>			
Glucose	1.61 $\pm$ 0.14	2.02 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	2.15 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>
Glycogen	5.18 $\pm$ 0.50	3.90 $\pm$ 0.60 <sup>a</sup>	4.35 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>
Lactate	12.30 $\pm$ 1.35	15.00 $\pm$ 1.37 <sup>a</sup>	18.36 $\pm$ 1.17 <sup>a</sup>
Protein	243.1 $\pm$ 1.34	218.4 $\pm$ 1.30 <sup>a</sup>	215.2 $\pm$ 1.24 <sup>a</sup>
Ammonia	0.012 $\pm$ 0.001	0.014 $\pm$ 0.001 <sup>a</sup>	0.014 $\pm$ 0.001 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Indicates difference between groups and control values ( $P<0.05$ ).

Glucose, lactate and ammonia were expressed in  $\mu\text{mol}/\text{g}$  tissue. Glycogen was expressed in  $\mu\text{mol}$  glycosyl-glucose/g tissue. Protein was expressed in mg/g tissue. Data represent the mean  $\pm$  SEM, ( $n=8$ ).

(by approximately 70%) after 96 h of exposure (Miron et al., 2005). Brain AChE inhibition was also observed in *Oreochromis niloticus* exposed to the insecticide diazinon (1 and 2 mg/L), where a high inhibition (93%) of brain AChE activity was observed (Üner et al., 2006). The same authors reported that animals exposed to diazinon showed erratic swimming, convulsions and respiratory dysfunctions, but no mortality was observed at the applied concentrations (Üner et al., 2006). In our experiment, no mortality or signs of poisoning were observed in silver catfish. However Miron et al. (2005) showed that clomazone exposure at concentrations above 10 mg/L provoked erratic swimming. Although organophosphates, such as folidol, are classical inhibitors of AChE activity, we have observed that many other classes of pesticides can also inhibit the enzyme activity. At the concentrations used in agriculture, both glyphosate (Roundup®) and clomazone (isooxazolidinone), none of which are organophosphates, caused brain AChE inhibition in silver catfish. The brain AChE inhibition demonstrated with glyphosate in this study leads to an accumulation of acetylcholine, causing the stimulation of the receptors. Thus, the inhibition of AChE can influence the process of cholinergic neurotransmission and cause undesirable effects in fish. Another aspect is related to surfactant POEA (polyethoxylated tallow amine). The AChE reduction in the brain seen in our investigation may be attributed to POEA, rather than to glyphosate itself. In fact, the POEA utilized in the glyphosate formulation is the most toxic component of the herbicide Roundup®. The LC<sub>50</sub> values (mg/L) for rainbow trout were between 8.2 and 27 for Roundup®, between 0.65 and 7.4 for POEA and between 140 and 240 for glyphosate (Giesy et al., 2000). Cholinesterase inhibition in the brain tissue or in the muscle is accepted as an adverse effect because activity is known to participate in neurotransmission (Fernández-Vega et al., 2002).

The liver is considered the main detoxifying tissue, and it reacts after stress caused by the toxicant. The results of the present study showed that silver catfish exposed to Roundup® exhibited an increase in glycogen levels in liver and a decrease in muscle when compared to control (Table 1). This decrease in muscle glycogen in this study may indicate that stress caused by the herbicide is accompanied by a rapid degradation of glycogen probably helping in the maintenance of energy of the metabolic process. The elevation of lactate also indicates metabolic disorders and a clear response against energy depletion. Other authors have also observed glycogen reduction in muscle after toxic stress (Shobha et al., 1989; Sancho et al., 1998; Begum and Vijayaraghavan, 1999; Aguiar et al., 2004). Our results are in agreement with those obtained by Gluszcak et al. (2006) in piavas (*L. obtusidens*) exposed to Roundup® exhibited a significant decrease of muscle glycogen. Crestani et al. (2006) observed muscle glycogen reduction in silver catfish exposed to the herbicide clomazone (0.5 and 1.0 mg/L) after 96 h. These results associated with our results obtained with glyphosate in the same fish suggest that the fish may use muscle glycogen as energy source to compensate stress situation. However, the glycogen responses seem to be fish specific. Muscle glycogen decreases in *Clarias batrachus* exposed to the organophosphate rogor (Begum and Vijayaraghavan, 1999), but no changes are observed in the liver glycogen store of *Anguilla anguilla* exposed to fenitrothion

(1/10 LC<sub>50</sub>) (Sancho et al., 1997). Ammonia levels increased in the liver and muscle at both concentrations tested in relation to the control (Table 1). Our results are in agreement with those obtained by Gluszcak et al. (2006) in piavas (*L. obtusidens*) where there were also elevations of ammonia in both tissues (liver and muscle) after glyphosate exposure. Similar results with an increase in ammonia content were obtained in liver and muscle of *C. batrachus* after carbamate exposure (Begum, 2004). Ammonia is a toxic metabolite and excess ammonia is known to trigger the operation of detoxification or utilization systems, chiefly by forming less toxic nitrogenous substances (Begum, 2004).

Total muscle protein was reduced at both concentrations of Roundup® in silver catfish (Table 1) and may indicate a compensatory response to herbicide toxicity. High energy demands might have led to the increase of protein catabolism (Sancho et al., 1998). Other authors have related protein reduction in fish tissues after exposure to toxicants (Sancho et al., 1998, 2000). Gluth and Hanke (1984) and David et al. (2004) also correlated a generalized hypoproteinemia in fish after toxic stress with a disturbance in osmoregulation. Thus, an increase in the ammonia concentration in silver catfish might be due to elevated protein catabolism of the tissues.

In the present study, the indicator of oxidative stress (TBARS) was changed after exposure to the herbicide Roundup®, increasing in the muscle tissue and decreasing in the brain of silver catfish, but in the liver tissue no changes were observed. Thus, the herbicide effect on TBARS levels varied depending of the tissue considered. Elevated levels of TBARS induced by aquatic contaminants such as pesticides have been observed by other authors (Li et al., 2003; Üner et al., 2006). According to Li et al. (2003), TBARS levels increased in the liver of *Carassius auratus* exposed to 3,4-dichloroaniline (0.4 mg/L) for 15 days. Lipid peroxidation measuring trough TBARS levels may differ among fish species. Elasmobranchs produce highest level of peroxides followed by seawater teleosts and freshwater fish (Ahmad et al., 2000). Differences are also attributed to the variation in antioxidant mechanisms of fish species (Radi et al., 1985; Ahmad et al., 2000). The results of the present investigation clearly indicates that exposure to sublethal concentrations of glyphosate caused a significant change in TBARS production in brain and muscle tissues. These results indicate that acute exposure at concentrations used in rice field of this herbicide is associated with muscle lipid peroxidation in silver catfish.

The present study showed no effects on catalase activity and TBARS production in the liver of silver catfish for both herbicide concentrations. Results observed on liver TBARS can be the cause of no-response of catalase activity in this tissue. The relation between TBARS levels and catalase activity in this tissue may result in compensatory response against herbicide toxicity. According to previous experiments in our laboratory, a reduction in catalase activity was observed in the liver of silver catfish exposed to clomazone (0.5 or 1.0 mg/L) after 12, 24 and 96 h (Crestani et al., 2007). Stress response is the reaction of the organism to a variety of adverse factors. The oxidative stress response and the antioxidant potential of fish both change with the species, habitat and feeding behavior. Oxidative stress may

suppress antioxidant defense enzyme activities, due to oxidative damage and a loss of compensatory mechanisms (Zhang et al., 2003). Although the results in the present study did not demonstrate alterations in liver catalase activity, we should not overlook the hypothesis of oxidative stress in the liver tissue.

The present study showed that the glyphosate concentrations used in agriculture may cause changes in the metabolic and enzymatic parameters of fish, such as AChE inhibition, lipid peroxidation and protein catabolism. The evaluation of these parameters can be used to monitor glyphosate (Roundup®) toxicity in silver catfish.

## References

- Aguiar, L.H., Moraes, G., Avilez, I.M., Altran, A.E., Corrêa, C.F., 2004. Metabolic effects of folidol 600 on the neotropical freshwater fish matrinxã, *Brycon cephalus*. *Environ. Res.* 95, 224–230.
- Ahmad, I., Hamid, T., Fatima, M., Chand, H.S., Jain, S.K., Athar, M., Raisuddin, S., 2000. Raisuddin, S. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Biochim. Biophys. Acta* 1523, 37–48.
- 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.
- Begum, G., 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.
- 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 Pirassumunga* 10, 53–60.
- Boyd, C.E., Tucker, C.S., 1992. Water Quality and Pond Soil Analyses for Aquaculture. Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University, Alabama, USA, p. 183.
- Bradford, M.M., 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.
- Brausch, M.J., Smith, N.P., 2007. Toxicity of three polyethoxylated tallowamine surfactant formulations to laboratory and field collected fairy shrimp, *Thamnocephalus platyurus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 52, 217–221.
- Chui, 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.
- Crestani, M., Menezes, C., Gluszcak, L., dos Miron, S.D., Lazzari, R., Duarte, F.M., Morsch, M.V., Pippi, L.A., Vieira, P.V., 2006. Effects of clomazone herbicide on hematological and some parameters of protein and carbohydrate metabolism of silver catfish *Rhamdia quelen*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 65, 48–55.
- Crestani, M., Menezes, C., Gluszcak, L., dos Miron, S.D., Spavevillo, R., Silveira, A., Gonçalves, F.F., Zanella, R., Loro, L.V., 2007. Effect of clomazone herbicide on biochemical and histological aspects of silver catfish (*Rhamdia quelen*) and recovery pattern. *Chemosphere* 67, 2305–2311.
- David, M., Mushigeri, S.B., Shivakumar, R., Philip, G.H., 2004. Response of *Cyprinus carpio* (Linn) to sublethal concentration of cypermethrin: alterations in protein metabolic profiles. *Chemosphere* 56, 347–352.
- 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., 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*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 72, 55–63.
- Filho, M.V.S., Oliveira, M.M., Salles, J.B., Bastos, V.L.F.C., Cassano, V.P.F., Bastos, J.C., 2004. Methyl-paraoxon comparative inhibition kinetics for acetylcholinesterases from brain of neotropical fishes. *Toxicol. Lett.* 153, 247–254.
- Fraga, C.G., Cavanagh, E., Carrasquedo, F., Lotito, S., Lucesoli, F., Oteiza, P.I., 1996. Antioxidant defenses and mechanisms of protection against oxygen radicals. *Physiology and Biochemistry of the Fishes of the Amazon*, Manaus, pp. 323–330.
- Gardner, S.C., Grue, C.E., 1996. Effects of Rodeo and Garlon 3A on nontarget wetland species in central Washington. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 441–451.
- Giesy, J.P., Dobson, S., Solomon, K.R., 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 167, 35–120.
- Gluszcak, L., Miron, S.D., Crestani, M., Fonseca, B.M., Pedron, A.F., Duarte, F.M., Vieira, P.L.V., 2006. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity, metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 65, 237–241.
- Gluth, G., Hanke, W., 1984. A comparison of physiological changes in carp, *Cyprinus carpio*, induced by several pollutants at sub-lethal concentration. II. The dependency on the temperature. *Comp. Biochem. Physiol. C* 79, 39–45.
- 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.
- Jirangkoorskul, 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*). *Sci. Asia* 28, 121–127.
- Li, W., Yin, D., Zhou, Y., Hu, S., Wang, L., 2003. 3,4-Dichloroaniline-induced oxidative stress in liver of crucian carp (*Carassius auratus*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 56, 251–255.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Miron, D., Crestani, M., Schetinger, R.M., Morsch, M.V., Baldissierotto, B., Tierno, A.M., Moraes, G., Vieira, P.L.V., 2005. Effects of the herbicides clomazone, quinclorac, and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 61, 398–403.
- Nelson, D.P., Kiesov, L.A., 1972. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 °C (with molar extinction coefficients of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution in the UV). *Anal. Biochem.* 49, 474–478.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351–358.
- Park, J.T., Johnson, M.J., 1949. A submicro determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 181, 149–151.
- Parvez, S., Raisuddin, S., 2005. Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 20, 112–117.
- Radi, A.A.R., Hai, D.Q., Matkovic, B., Gabrielak, T., 1985. Comparative antioxidant enzyme study in freshwater fish with different types of feeding behavior. *Comp. Biochem. Physiol. C* 81, 395–399.
- Rodrigues, B.N., Almeida, F.S., 1998. Guia de Herbicidas. Londrina, Paraná-Brazil. 648 pp.
- Sancho, E., Ferrando, M.D., Andreu, E., 1997. Response and recovery of acetylcholinesterase activity in the European eel *Anguilla anguilla* exposed to fenitrothion. *J. Environ. Sci. Health, Part B, Pestic. Food Contam. Agric. Wastes* 32, 915–928.
- Sancho, E., Ferrando, M.D., Fernández, C., 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., Janaiiah, C., 1989. Changes in carbohydrate metabolism of *Clarias batrachus* (Linn) when exposed to two organophosphorus insecticides. *J. Environ. Biol.* 10, 197–204.
- Schlenk, D., Wolford, L., Chelius, M., Steevens, J., Chan, K.M., 1997. Effect of arsenite, arsenate, and the herbicide monosodium methyl arsonate (MSMA)



- on hepatic metallothionein expression and lipid peroxidation in channel catfish. *Comp. Biochem. Physiol. C* 118, 177–183.
- Sevgiler, Y., Oruç, E.O., Üner, N., 2004. Evaluation of etoxazole toxicity in the liver of *Oreochromis niloticus*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 78, 1–8.
- Üner, N., Oruç, E.O., Sevgiler, Y., Sahin, N., Durmaz, H., Usta, D., 2006. Effects of diazinon on acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation in the brain of *Oreochromis niloticus*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 21, 241–245.
- 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. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 31, 117–165.
- Zhang, J., Shen, H., Wang, X., Wu, J., Xue, Y., 2003. Effects of chronic exposure of 2,4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish *Carassius auratus*. *Chemosphere* 55, 167–174.

## 5 DISCUSSÃO

Devido ao grande cultivo de espécies nativas regionais como piavas e jundiás e o uso crescente de herbicidas nas lavouras agrícolas, tornou-se fundamental a realização deste estudo. O uso extensivo de agrotóxicos pode aumentar de forma grave a contaminação dos corpos d'água. O risco ambiental é maior com aplicações nas proximidades de rios ou em áreas alagáveis, resultando assim, na toxicidade de muitas espécies não-alvo, incluindo os peixes (CARR & CHAMBERS, 1996; ORUÇ & ÜNER, 1999, GIESY *et al.*, 2000; JIRAUNGKOORSKUL *et al.*, 2002). Existem poucas pesquisas abordando aspectos de toxicidade com herbicidas em peixes, porém os resultados obtidos neste trabalho podem ser comparados apenas com as condições de laboratório, já que em condições naturais outros fatores podem interferir na biodisponibilidade dos agroquímicos. Sendo assim, verificou-se, entre outros parâmetros, se a exposição a uma formulação comercial do herbicida glyphosate afeta a atividade da enzima acetilcolinesterase em cérebro e músculo de piavas e jundiás.

De acordo com os resultados obtidos, observou-se uma inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) em cérebros de piavas e jundiás após exposição ao herbicida glyphosate em diferentes concentrações. Entretanto, no tecido muscular das espécies expostas não ocorreram alterações significativas quando comparadas ao controle. Esses achados corroboram com outros encontrados em nosso laboratório onde obtiveram-se resultados semelhantes em jundiás expostos ao herbicida clomazone (0,5 ou 1,0 mg/L) (CRESTANI *et al.*, 2007), em piavas expostas ao herbicida clomazone (0,5 mg/L) por 96 h (MORAES *et al.*, 2007) e em piavas expostas ao herbicida 2,4-D (1 ou 10 mg/L) (FONSECA *et al.*, 2008). Outras pesquisas realizadas com jundiás demonstraram inibição da atividade da AChE cerebral e muscular quando expostos ao herbicida clomazone (5, 10 ou 20 mg/L) por 96 h (MIRON *et al.*, 2005). Essa inibição da atividade da AChE pode estar relacionada com o aumento das catecolaminas, o que conduz a uma condição de hiperglicemia (ÜNER *et al.*, 2006). Além disso, a inibição da acetilcolinesterase pode

estar relacionada com o grau de inervação do tecido considerado, uma vez que quanto maior a inervação mais elevada à suscetibilidade de inibição (ALMEIDA *et al.*, 2005). De acordo com Giesy *et al.* (2000), os efeitos tóxicos do glyphosate não se devem basicamente ao herbicida em si, mas ao surfactante POEA, o qual tem sido utilizado em sua formulação com o intuito de potencializar o efeito do ingrediente ativo, glyphosate. Nesse estudo, podemos inferir que a inibição da atividade da AChE em cérebros de piavas e jundiás pode ser mais atribuída ao surfactante da formulação comercial utilizada. Em estudos realizados com Rainbow trout a CL<sub>50</sub> foi entre 8,2 e 27 mg/L para o Roundup<sup>®</sup>, entre 0,65 e 7,4 mg/L para o POEA e entre 140 e 240 mg/L para o glyphosate sozinho (GIESY *et al.*, 2000). A atividade da AChE cerebral pode ser influenciada por alguns fatores como a temperatura ambiental, espécies, ciclo reprodutivo, sexo, idade, etc (YI *et al.*, 2006). E ainda, sua inibição provoca várias alterações fisiológicas, levando a diversos efeitos comportamentais, como tremores, letargia, nado errático, entre outros (SANCHO *et al.*, 2000; FERNÁNDEZ-VEGA *et al.*, 2002). Miron *et al.* (2005) observou alterações comportamentais, como nado errático e letargia após exposição de jundiás aos herbicidas clomazone (10 ou 20 mg/L) e quinclorac (100, 375 ou 400 mg/L) por 96 h. Entretanto, nesse estudo não foram avaliados parâmetros comportamentais após exposição de piavas e jundiás a diferentes concentrações do herbicida glyphosate.

Outros parâmetros avaliados neste estudo foram os hematológicos. O sangue de peixes é muito sensível à exposição de poluentes ambientais. A exposição de piavas a uma formulação comercial glyphosate afetou os índices hematológicos no sangue. Ocorreu uma diminuição destes parâmetros, como hematócrito, hemoglobina e contagem de eritrócitos, indicando, com isso, um possível quadro de anemia leve nessa espécie. Outros trabalhos também demonstraram um decréscimo nos valores hematológicos após exposição de peixes a poluentes ambientais (SANCHO *et al.*, 2000; SIANG *et al.*, 2007).

Como o fígado é o principal órgão detoxificador do organismo e pode ser afetado por diferentes classes de agrotóxicos, é de suma importância o seu bom funcionamento. Após a exposição de piavas e jundiás ao herbicida glyphosate, observaram-se desordens metabólicas, como alterações no conteúdo de glicogênio,

glicose, lactato, proteína e amônia. Pode-se dizer que as piavas sofreram em um primeiro momento uma situação de estresse, ocasionando assim hipóxia tecidual e hiperglicemia. Não foram dosados os níveis de cortisol nessas espécies, no entanto, tal hormônio poderia estar elevado devido ao quadro de estresse demonstrado. De acordo com Soso *et al.* (2007) o aumento dos níveis do hormônio cortisol no plasma de jundiás após exposição a um agente estressante é a resposta primária frente a essa situação. Considerando a redução do glicogênio nos tecidos hepático e muscular em piavas e o aumento dos níveis de lactato muscular, pode-se dizer que o peixe estava utilizando uma estratégia fermentativa, pois o peixe utiliza muito o metabolismo anaeróbico quando se encontra em situações de estresse, a fim de obter energia rapidamente.

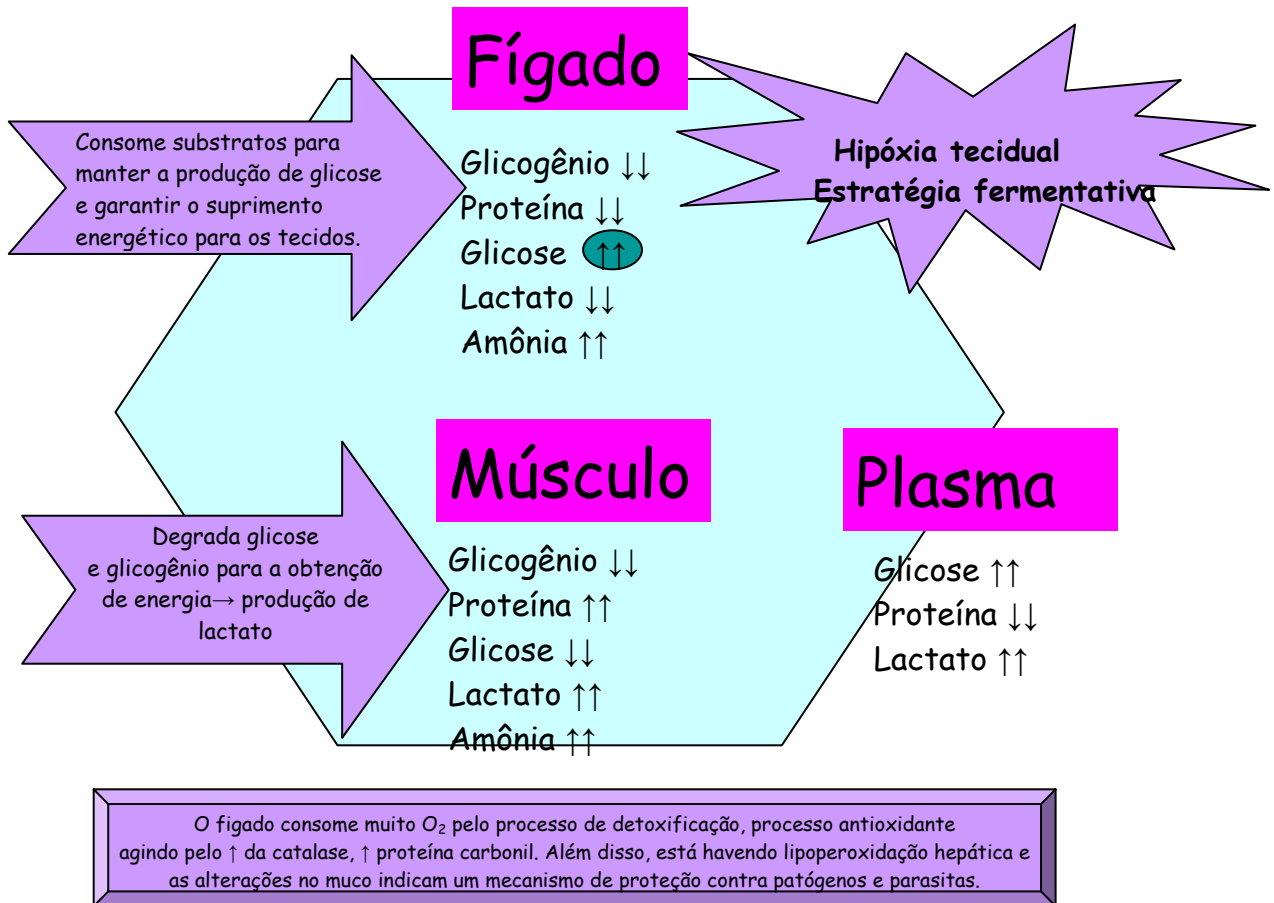
No entanto, em jundiás ocorreram outras alterações, mas também com o intuito de manter a glicemia e armazenar glicose, garantindo o suprimento energético para os tecidos. No tecido muscular, os jundiás também utilizavam uma estratégia fermentativa e estavam degradando o glicogênio para manter o metabolismo do tecido. Foram observados resultados similares a este estudo por Sancho *et al.* (2000) após exposição de enguias ao pesticida fenitroton. Além disso, essas respostas podem variar entre as espécies, pois outros trabalhos demonstraram um decréscimo do glicogênio muscular como em *Clarias batrachus* após exposição ao organofosfato rogor (BEGUM & VIJAYARAGHAVAN, 1999), porém nenhuma alteração foi observada nos seus níveis em fígado de *Anguilla anguilla* exposto ao fenitroton (1/10 CL<sub>50</sub>) (SANCHO *et al.*, 1997). Da mesma forma que neste estudo, jundiás expostos ao herbicida clomazone (0,5 ou 1,0 mg/L) demonstraram um aumento nos valores de glicogênio hepático (CRESTANI *et al.*, 2006). O aumento da amônia observado em ambas as espécies e tecidos pode ser devido ao catabolismo das proteínas para obter energia utilizada nos processos metabólicos e de detoxificação do organismo. A amônia é o produto final do metabolismo das proteínas e os peixes excretam grandes quantidades deste metabólito na água. Begum (2004), também obteve resultados similares em *Clarias batrachus* após exposição à carbamato. Além disso, pode-se observar no nosso trabalho uma diminuição da proteína do plasma em piavas expostas ao herbicida glyphosate,

sendo essa, uma resposta compensatória à toxicidade do herbicida. Estes resultados estão de acordo com o aumento da amônia nos dois tecidos. Outros autores correlacionaram a hipoproteinemia com distúrbios na osmorregulação (GLUTH & HANKE, 1984; EI-SAYED *et al.*, 2007). A osmorregulação é um mecanismo essencial para a sobrevivência do peixe, pois é a capacidade que alguns animais possuem em manter a pressão osmótica constante independentemente da do meio externo, dentro de certa faixa de variação.

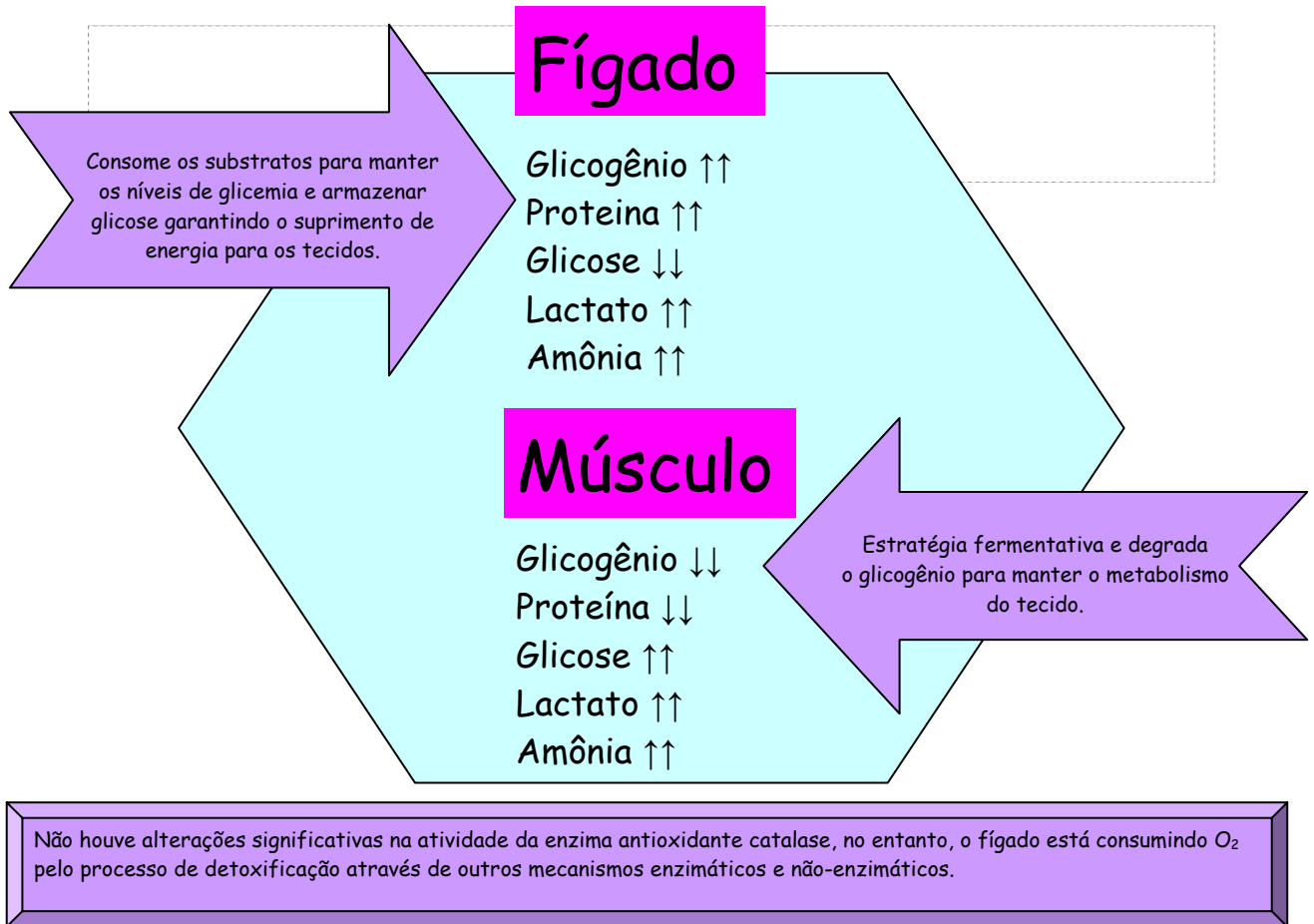
Parâmetros de estresse oxidativo são muito utilizados para avaliar a toxicidade de herbicidas em peixes. Neste trabalho houve alterações nos níveis de TBARS após a exposição de ambas as espécies ao glyphosate. Ocorreu lipoperoxidação no tecido muscular de jundiás, porém em piavas houve um aumento da formação de TBARS somente no tecido hepático. Outros trabalhos realizados em nosso laboratório demonstraram dados semelhantes quando piavas foram expostas ao herbicida clomazone (0,5 mg/L) e propanil (3,6 mg/L) (MORAES *et al.*, 2007). No entanto, Crestani *et al.* (2006) encontrou um aumento dos níveis de TBARS no fígado de jundiás após exposição ao herbicida clomazone (0,5 mg/L) em 96 h. Além disso, Li *et al.* (2003) também encontrou um aumento dos níveis de TBARS no fígado de *Carassius auratus* após exposição à 3,4-dicloroanilina. Com base nesses resultados, pode-se dizer que essas respostas dependem basicamente de três fatores: do tecido considerado; das diferentes espécies e da variação dos mecanismos antioxidantes dessas espécies. Os resultados observados nos níveis de TBARS em fígados de jundiás pode ter sido a causa da ausência de resposta apresentada na atividade da enzima antioxidante catalase. A relação entre estes dois parâmetros (TBARS e catalase) pode resultar em uma resposta compensatória devido à toxicidade desse herbicida. Observaram-se alterações na atividade da catalase após exposição de piavas ao herbicida glyphosate. O aumento da atividade da enzima foi de acordo com a elevação da concentração do herbicida utilizado neste estudo (3, 6, 10 ou 20 mg/L de glyphosate). Martinez & Langiano (2008) observaram um aumento da atividade da catalase no tecido hepático de *Prochilodus lineatus* após exposição ao herbicida Roundup (10 mg/L). De acordo com outros estudos realizados em nosso laboratório, houve um aumento da atividade da enzima

catalase quando piavas foram expostas ao herbicida clomazone (0,5 mg/L) e propanil (3,6 mg/L) (MORAES *et al.*, 2007). Sayeed *et al.* (2003) observou resultados similares quando expôs *Channa punctatus* ao inseticida deltametrina. Entretanto, Crestani *et al.* (2007) observou uma diminuição na atividade da enzima catalase após exposição de jundiás ao herbicida clomazone (0,5 mg/L). De acordo com esses resultados, pode-se dizer que outros mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos do sistema de defesa antioxidante podem estar atuando na detoxificação do herbicida glyphosate nos peixes estudados. A presença dos grupos carbonila em proteínas tem sido usado como marcador de EROs. Observou-se que houve um aumento de formação de carbonilas de proteína no tecido hepático de piavas expostas ao herbicida glyphosate. Parvez & Raisuddin (2005), também observaram um aumento de carbonilação de proteínas em *Channa punctatus* expostos a diferentes pesticidas. Os resultados obtidos neste estudo, como o aumento dos grupos carbonila nas cadeias laterais dessas proteínas, pode indicar que estava ocorrendo um rompimento no metabolismo normal das proteínas, resultando em acumulação de moléculas danosas. Portanto, a relação entre os níveis de TBARS, atividade da catalase e o aumento da formação de grupos carbonila, indicou uma resposta adaptativa que o peixe estava apresentando devido à toxicidade do herbicida, ocorrendo dano oxidativo principalmente no tecido hepático.

Alterações dos parâmetros da camada mucosa foram observadas após exposição das piavas a este herbicida. As glicoproteínas representam um dos maiores componentes da secreção mucosa que reveste a pele do peixe (TROMEUR *et al.*, 1992; SABÓIA-MORAES *et al.*, 1996). O aumento das proteínas e dos açúcares redutores observados neste estudo pode indicar um mecanismo de proteção que o peixe estava utilizando contra agentes externos e o desenvolvimento microbial, já que o muco atua na osmorregulação e na defesa contra patógenos e parasitas. Em resumo, esses resultados indicam que essa formulação comercial de glyphosate provocou alterações nos parâmetros analisados em piavas (Esquema 1) e jundiás (Esquema 2), sendo esses, indicadores primários de toxicidade a tal herbicida. Porém, outros estudos são necessários para esclarecer os mecanismos de toxicidade deste agrotóxico.



Esquema 1 - Algumas alterações observadas em piavas (*Leporinus obtusidens*) após exposição a uma formulação comercial do herbicida glyphosate.



Esquema 2 - Algumas alterações observadas em jundiás (*Rhamdia quelen*) após exposição a uma formulação comercial do herbicida glyphosate.



## 6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados pode-se concluir que:

- A inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase de cérebro em piavas e jundiás pode estar relacionada com o grau de inervação desse tecido.

- Os índices hematológicos no sangue de piavas apresentaram uma diminuição, acarretando, com isso, uma situação de anemia leve. Ambas espécies demonstraram desordens metabólicas e utilizaram uma estratégia fermentativa para manutenção do metabolismo devido a toxicidade deste agrotóxico.

- As alterações observadas em piavas e jundiás na atividade da enzima antioxidante catalase demonstraram um possível dano oxidativo no tecido hepático gerado por esse herbicida.

- As modificações na formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em diferentes tecidos de ambas as espécies e o aumento dos níveis de carbonilação de proteínas em fígado de piavas, evidenciaram uma situação de estresse oxidativo. Esse composto químico acarretou um desequilíbrio entre a atividade antioxidante e a formação de espécies reativas de oxigênio.

- A composição do muco de piavas demonstrou um aumento das concentrações de açúcares solúveis e proteínas após exposição ao herbicida, indicando um mecanismo de proteção contra patógenos e parasitas.

## 7 PERSPECTIVAS

Tendo em vista os promissores resultados obtidos nesta tese, poderíamos aprofundar ainda mais os estudos relacionados ao aspecto toxicológico desse herbicida. Assim, poderíamos realizar estudos a partir da concretização dos seguintes objetivos:

- \* Dosar os sub-produtos (POEA) deste herbicida na água e nos tecidos dos peixes.
- \* Realizar testes em ambientes (a campo) que recebam resíduos deste produto.
- \* Analisar outros parâmetros enzimáticos e não-enzimáticos de estresse oxidativo nessas espécies.
- \* Comparar as diferentes formulações do herbicida glyphosate utilizando concentrações de relevância ambiental.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALMEIDA, L. C.; AGUIAR, L. H.; MORAES, G. Effect of methyl parathion on the muscle and brain acetylcholinesterase activity of matrinxã (*Brycon cephalus*). **Cienc. Rural**, v. 35, n. 6, p.1412-1416, 2005.

ALMROTH, C. B.; STURVE, J.; BERGLUND, A.; FÖRLIN, L. Oxidative damage in eelpout (*Zoarces viviparus*), measured as protein carbonyls and TBARS, as biomarkers. **Aquat Toxicol**, v. 73, p. 171-180, 2005.

ANDRIAN, I. DE F.; DÓRIA, C. DA C.; TORRENTE, G.; FERRETI, C. M. L. Espectro alimentar e similaridade na composição de quatro espécies de *Leporinus* (Characiformes, Anostomidae) do Rio Paraná, Brasil. **Revista Unimar**, v. 16, n. 3, p. 97-106, 1994.

BALDISSEROTTO, B.; GOMES, C. L. Espécies nativas para piscicultura no Brasil. In Tataje, R. D., Filho, Z. E. (Eds), **Cultivo do gênero *Leporinus***. Ed., UFSM, Brasil, 2005, 81-103 p.

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

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

BEGUM, G.; VIJAYARAGHAVAN, S. Effect of acute exposure of the organophosphate insecticide rogor on some biochemical aspects of *Clarias batrachus* (Linnaeus). **Environ Res A**, v. 80, p. 80-83, 1999.

BIDINOTTO, P. M.; MORAES, G.; SOUZA, R. H. S. Hepatic glycogen and glucose in eight tropical freshwater teleost fish: A procedure for field determinations of micro samples. **Bol Tec CEPTA**, Pirassununga, v. 10, p. 53-60, 1997.

BRAUSCH, M. J.; SMITH, N. P. Toxicity of Three Polyethoxylated Tallowamine Surfactant Formulations to Laboratory and Field Collected Fairy Shrimp, *Thamnocephalus platyurus*. **Arch Environ Contam Toxicol**, v. 52, p. 217-221, 2007.

BRETAUD, S. ; TOUTANT, J. P. ; SAGLIO, P. Effects of Carbofuran, Diuron, and Nicosulfuron on Acetylcholinesterase Activity in Goldfish (*Carassius auratus*). **Ecotoxicol Environ Safety**, v. 47, p. 117-124, 2000.

CAMERON, A. M.; ENDEAN, R. Epidermal secretions and the evolution of venom glands in fishes. **Toxicon**, v. 11, p. 401-410, 1973.

CARR, R. L.; CHAMBERS, J.E. Kinetic analysis of the in vitro inhibition, aging and reactivation of brain acetylcholinesterase from rat and channel catfish by paraoxon and chlorpyrifos-oxon. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 139, p. 365-373, 1996.

CARVALHO, J. C. **Mecanismo de ação dos herbicidas**. Disponível em <<http://www.hrac-br.com.br/textos.htm>>. Acesso em: 06 nov. 2007.

CERÓN, J. J.; FERRANDO, M. D.; SANCHO, E.; GUTIERREZ-PANIZO, C.; ANDREU-MOLINER E. Effects of diazinon exposure on cholinesterase activity in different tissues of European Eel (*Anguilla anguilla*). **Ecotoxicol Environ Safety**, v. 35, p. 222-225, 1996.

CHANDRASEKARA, L. W. H. U.; PATHIRATNE, A. Body size-related differences in the inhibition of brain acetylcholinesterase activity in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by chlorpyrifos and carbosulfan. **Ecotoxicol Environ Safety**, v. 67, p. 109–119, 2007.

CHUIKO, G. M. 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**, v. 127, p. 233-242, 2000.

CHUIKO, G. M.; PODGORNAYA, V. A.; ZHELNIN, Y. Y. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in brain and plasma of freshwater teleosts: cross-species and cross-family differences. **Comp Biochem Physiol Part B**, v. 135, p. 55-61, 2003.

CORNISH, I.; MOON, T. W. Glucose and lactate kinetics in American eel *Anguilla rostrata*. **Am J Physiol**, v. 249, p. 67-72, 1985.

COX, C.; SURGAN, M. Unidentified inert ingredients in pesticides: implications for human and environmental health. **Environ Health Perspect**, v. 114, p. 1803-806, 2006.

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

CRESTANI, M.; MENEZES, C.; GLUSCZAK, L.; MIRON, DOS S. D.; SPANEVELLO, R.; SILVEIRA, A.; GONÇALVES, F. F.; ZANELLA, R.; LORO, L. V. Effect of clomazone herbicide on biochemical and histological aspects of silver catfish (*Rhamdia quelen*) and recovery pattern. **Chemosphere**, v. 67, p. 2305-2311, 2007.

DAS, B.K.; MUKHERJEE, S. C. Toxicity of cypermethrin in *Labeo rohita* fingerlings: biochemical, enzymatic and haematological consequences. **Comp Biochem Physiol C**, v. 134, p. 109-121, 2003.

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

EL-SAYED, Y.S.; SAAD, T.T.; EL-BAHR, S.M. Acute intoxication of deltamethrin in monosex Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* with special reference to the clinical, biochemical and haematological effects. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 24, p. 212-217, 2007.

FERNÁNDEZ-VEGA, C.; SANCHO, E.; FERRANDO, M.D.; ANDREU, E. Thiobencarb-induced changes in acetylcholinesterase activity of the fish *Anguilla anguilla*. **Pest Biochem Physiol**, v. 72, p. 55-63, 2002.

FONSECA, M. B.; GLUSCZAK, L.; MORAES, B. S.; MENEZES, C. C.; PRETTO, A.; TIERNO, M. A.; ZANELLA, R.; GONÇALVES, F. F.; LORO, V. L. The 2,4-D herbicide effects on acetylcholinesterase activity and metabolic parameters of piava freshwater fish (*Leporinus obtusidens*). **Ecotoxicol Environm Safety**, v. 69, n. 3, p. 416-420, 2008.

FRAGA, C.G.; CAVANAGH, E.; CARRASQUEDO, F.; LOTITO, S.; LUCESOLI, F.; OTEIZA, P.I. Antioxidant defenses and mechanisms of protection against oxygen radicals. In: **Physiology and biochemistry of the fishes of the Amazon**, Manaus. p. 323-330, 1996.

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.; FERRANDO M. D.; SANCHEZ, S.; GIMENO, L. O.; ANDREU, E. Pesticide effects on eel metabolism. **Ecotoxicol Environ Safety**, v. 31, p. 153-157, 1995.

GLUTH, G.; HANKE, W. A comparison of physiological changes in carp, *Cyprinus carpio*, induced by several pollutants at sub-lethal concentration. In: The dependency on the temperature. **Comp Biochem Physiol C**, v. 79, p. 39-45, 1984.

GODOY, M. P. **Peixes do estado de Santa Catarina**. Florianópolis:UFSC, 1987, 571p.

GOMES, L. C.; GOLOMBIESKI, J.; CHIPPARI-GOMES, A. R.; BALDISSEROTTO, B. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). **Cienc. Rural**, v. 30, n. 1, p. 79-185, 2000.

GOTTSCHALK, A.; BHARGAVA, A. S. In Teleost osmoregulation in glycoproteins. Their composition, structure and function. In **glycoproteins** (Edited by Gottschalk A.), pp. 810 – 829, Elsevier, Amsterdam, 1972.

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

HAYASHI, C.; RIBEIRO, R. P.; FURUYA, W. M.; FURUYA, V. R. B. **Curso de atualização em piscicultura – espécies nativas e exóticas**. *Apostila*. FADEC/UEM, Maringá, 1996, 185 p.

HINTON, D. E.; SEGNER, H.; BRAUNBECK, T. Toxic responses of the liver. In: Schlenk, D., Benson, W.H. **Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts**. London, v.1, 2001, 225-266 p.

IGER, Y.; LOCK, R. A. C.; JENNER, H. A.; WENDELAAR BONGA, S. E. Cellular responses in the skin of carp (*Cyprinus carpio*) exposed to cooper. **Aquat Toxicol**, v. 29, 49-64, 1994a.

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

JÚNIOR, W. D.; MOURGUÉS-SCHURTER, L. R. Comportamento alimentar, determinação do horário de fornecimento e do tempo de disponibilidade da ração para *Leporinus obtusidens* Valenciennes, 1847 (Osteichthyes, Characiformes, Anostomidae). **Ciênc Agrotec**, Lavras, v. 25, p. 1043 -1050, 2001.

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

KHANGAROT, B. S.; TRIPATHI, D. M. The stereoscan observations of the skin of catfish, *Saccobranchus fossilis*, following chromium exposure. **J Environ Sci Health, A**, v. 7, n. 4, p. 1141 – 1148, 1992.

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

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 3ªed. São Paulo: Sarvier, 2002, 975 p.

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

LIONETTO, M. G.; CARICATO, R.; GIORDANO, M. E.; PASCARIELLO, M. F.; MARINOSCI, L.; SCHETTINO T. Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area. **Marine Poll Bull**, v. 46, p. 324–330, 2003.

LIU, C.; YU, K.; SHI, X.; WANG, J.; LAM, P. K. S.; WU, R. S. S.; ZHOU, B. Induction of oxidative stress and apoptosis by PFOS and PFOA in primary cultured hepatocytes of freshwater tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquat Toxicol**, v. 82, p. 135 – 143, 2007.

MARSHALL, W. S. On the involvement of mucous secretion in teleost osmoregulation. **Can J Zool**, v. 56, p. 1088-1091, 1978.

MASSOULIE, J.; PEZZEMENTE, L.; BOM, S.; KREJCI, E. Molecular and cellular biology of cholinesterases. **Progr Neurobiol**, v. 41, p. 31-41, 1993.

MIRON, D.; CRESTANI, M.; SCHETINGER, R. M.; MORSCH, M. V.; BALDISSEROTTO, B.; TIerno, A. M.; MORAES, G.; VIEIRA, P. L. V. Effects of the herbicides clomazone, quinclorac, and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae). **Ecotoxicol Environ Safety**, v. 61, p. 398-403, 2005.

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

NOMURA, H.; 1984. **Dicionário dos peixes do Brasil**. Brasília: Editerra, p 482.

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



ORUÇ, E. Ö.; 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.

OURTH, D. D. Secretory IgM, lysozymes and lymphocytes in the skin mucus of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*, **Dev Comp Immunol**, v. 4, p. 65-74, 1980.

PAN, G.; DUTTA, H.M. The inhibition of Brain Acetylcholinesterase Activity of Juvenile Largemouth Bass *Micropterus salmoides* by Sublethal Concentrations of Diazinon. **Environ Res**, v. 79, p.133-137, 1998.

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

PERES, W. **Radicais livres em níveis biológicos**, Ed. Pallotti, 1994.

PEY, A.; SABORIDO, A.; BLÁZQUEZ, I.; DELGADO, J.; MEGÍAS, A. Effects of prolonged stanozolol treatment on antioxidant enzyme activities, oxidative stress markers, and heat shock protein HSP72 levels in rat liver. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 87, p. 269-277, 2003.

PIAIA, R., RADÜNZ NETO, J. Avaliação de diferentes fontes protéicas sobre o desempenho inicial de larvas do jundiá *Rhamdia quelen*. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 27, n. 2, p. 319 – 323, 1997a.

PIMPÃO, C. T.; ZAMPRONIO, A. R.; SILVA DE ASSIS, H. C. Effects of deltamethrin on hematological parameters and enzymatic activity in *Ancistrus multispinis* (Pisces, Teleostei). **Pest Biochem Physiol**, v. 88, p. 122-127, 2007.

RAHIMI, R.; ABDOLLAHI, M. A review on the mechanisms involved in hyperglycemia induced by organophosphorus pesticides. **Pest Biochem Physiol**, v. 88, p. 115-121, 2007.

ROCHE, H.; BOGÉ, G. In vivo effects of phenolic compounds on blood parameters of a marine fish (*Dicentrarchus labrax*). **Comp Biochem Physiol Part C**, v. 125, p. 345-353, 2000.

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia de Herbicidas**, 5ª ed. Londrina: IAPAR, 2005, 648p.

ROEX, E. W. M.; KEIJZERS, R.; VAN GESTEL, C. A. M. Acetylcholinesterase inhibition and increased food consumption rate in the zebrafish, *Danio rerio*, after chronic exposure to parathion. **Aquat Toxicol**, v. 64, p. 451 – 460, 2003.

SABÓIA-MORAES, S. M. T.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J.; MOTA, D. L.; BITTENCOURT, A. M. Mucous cell types in the branchial epithelium of the euryhaline fish *Poecilia vivipara*. **J Fish Biol**, v. 49, p. 545-548, 1996.

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

SAHIB, I. K. A.; SAMBASIVA RAO, K. R. S.; RAMANA RAO, K. V. Effect of malathion on protein synthetic potentiality of the tissues of the teleost, *Tilapia mostambica* (Peters), as measured through incorporation of (14C) amino acids. **Toxicol Lett**, v. 20, p. 63-67, 1984.

SANCHO, E.; FERRANDO, M. D.; ANDREU, E. Response and recovery of acetylcholinesterase activity in the European eel *Anguilla anguilla* exposed to fenitrothion. **J Environ Sci Health B**, v. 32, n. 6, p. 915-928, 1997.

SANCHO, E.; FERRANDO, M. D.; FERNÁNDEZ, C.; ANDREU, E. Liver energy metabolism of *Anguilla anguilla* after exposure to fenitrothion. **Ecotoxicol Environ Safety**, v. 41, p. 168-175, 1998.

SANCHO, E.; CERÓN, J. J.; FERRANDO, M. D. Cholinesterase activity and hematological parameters as biomarkers of sublethal molinate exposure in *Anguilla anguilla*. **Ecotoxicol Environ Safety**, v. 46, p. 81-86, 2000.

SAYEED, I.; PARVEZ, S.; PANDEY, S.; BIN-HAFEEZ, B.; RIZWANUL, H.; RAISUDDIN, S. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. **Ecotoxicol Environ Safety**, v. 56, p. 295-301, 2003.

SEVGILER, Y.; ORUÇ, E. O.; ÜNER, N. Evaluation of etoxazole toxicity in the liver of *Oreochromis niloticus*. **Pest Biochem Physiol**, v. 78, p. 1-8, 2004.

SEVGILER, Y.; PINER, P.; DURMAZ, H.; ÜNER, N. Effects of N-acetylcysteine on oxidative responses in the liver of fenthion exposed *Cyprinus carpio*. **Pest Biochem Physiol**, v. 87, p. 248-254, 2007.

SHEPARD, K. L. Functions for fish mucus. **Rev Fish Biol Fisher**, v. 4, p. 401- 429, 1994.

SCHERER, R.; AUGUSTI, P. R.; BOCHI, V. C.; STEFFENS, C.; FRIES, L. L. M.; DANIEL, A. P.; KUBOTA, E. H.; NETO, J. R.; EMANUELLI, T. Chemical and microbiological quality of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) slaughtered by different methods. **Food Chem**, v. 99, p. 136-142, 2006.

SIANG, H. Y.; YEE, L. M.; SENG, C. T. Acute toxicity of organochlorine insecticide endosulfan and its effect on behaviour and some hematological parameters of Asianswamp eel (*Monopterus albus*, Zuiew). **Pest Biochem Physiol**, v. 89, p. 46-53, 2007.

SMITH, E. A.; OEHME, F. W. The biological activity of glyphosate to plants and animals: a literature review. **Vet Hum Toxicol**, v. 34, p. 531-543, 1992.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase – new roles for an old actor. **Nat Rev Neurosci**, v. 2, p. 294-302, 2001.

SOSO, A. B.; BARCELLOS, L. J. G.; RANZANI-PAIVA, M. J.; KREUTZ, L. C.; QUEVEDO, R. M.; ANZILIERO, D.; LIMA, M.; SILVA, L. B.; RITTER, F.; BEDIN, A. C.; FINCO, J. A. Chronic exposure to sub-lethal concentration of glyphosate-based herbicide alters hormone profiles and effects reproduction of female Jundiá (*Rhamdia quelen*). **Environ Toxicol Pharm**, v. 23, p. 308-313, 2007.

STEBBENS, W.E. Oxidative stress, toxic hepatitis, and antioxidants with particular emphasis on zinc. **Exp Mol Pathol** v. 75, p. 265-276, 2003.

QUINIQU, S. M. A.; BIGLER, S.; CLEM, L. W.; BLY, J. E. Effects of water temperature on mucous cell distribution in channel catfish epidermis: a factor in winter saprolegniasis. **Fish & Shellfish Immunol**, v. 8, p. 1-11, 1998.

TOMLIN, C. D. S. The pesticide manual. 12 ed. **Farnham: The British Crop Protection Council**, 2000.

TORRES, B. B. **Nutrição e esporte - uma abordagem bioquímica**. Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, USP, 2003.

TROMEUR, F.; GUERARD, F.; LE GAL, Y. Mucous glycoproteins from the ray *Raja batis*. **Comp Biochem Physiol B**, v. 102, p. 773-778, 1992.

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

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

VAL, A. L.; VAL, V. M. A.; RANDALL, D. J. **Physiology and biochemistry of the fishes of the Amazon**. INPA, Manaus, 1996, 420 p.

Winston, G.W. Mini review. Oxidants and antioxidants in aquatic animals. **Comp Biochem Physiol C**, v.100, p. 173-176, 1991.

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

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

YI, M. Q.; LIU, H. X.; SHI, X. Y.; LIANG, P.; GAO, X. W. Inhibitory effects of four carbamate insecticides on acetylcholinesterase of male and female *Carassius auratus* in vitro. **Comp Biochem Physiol C**, v. 143, p. 113 -116, 2006.

## DEMAIS TRABALHOS DESENVOLVIDOS DURANTE O CURSO DE DOUTORADO

◆Crestani, M., Menezes, C. C., Gluszczak, L., Miron, dos S. D., Lazzari, R., Duarte, F. M., Morsch, M. V., Pippi, L. A., \*Vieira, P. L. V. Effects of clomazone herbicide on hematological and some parameters of protein and carbohydrate metabolism of silver catfish *Rhamdia quelen*. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 65, 48-55, 2006.

◆Crestani, M., Menezes, C. C., Gluszczak, L., Miron, dos S. D., Spanevello, R., Silveira, A., Gonçalves, F. F., Zanella, R., \*Loro, L. V. Effects of clomazone herbicide on biochemical and histological aspects of silver catfish (*Rhamdia quelen*) and recovery pattern. **Chemosphere** 67, 2305- 2311, 2007.

◆Fonseca, M. B.; Gluszczak, L.; Moraes, B. S.; Menezes, C. C.; Pretto, A.; Tierno, M. A.; Zanella, R.; Gonçalves, F. F.; Loro, V. L. The 2,4-D herbicide effects on acetylcholinesterase activity and metabolic parameters of piava freshwater fish (*Leporinus obtusidens*). **Ecotoxicol Environm Safety**, v. 69, n. 3, p. 416-420, 2008.

◆Fonseca, B. M., Menezes, C. C., Gluszczak, L., Moraes, S. B., Pretto, A., \*Loro, L. V. Effects of glyphosate herbicide on metabolic parameters and acetylcholinesterase activity of teleostean fish *Leporinus obtusidens* (piava). Em fase de redação.

◆Gluszczak, L., Moraes, S. B., Fonseca, B. M., Pretto, A., Menezes, C. C., Schetinger, C. R. M., Morsch, M. V., \*Loro, L. V. Glyphosate-based herbicide affects toxicological parameters in jundiás (*Rhamdia quelen*) and piavas (*Leporinus obtusidens*). A comparative study. Em fase de redação.

◆ Gluszczak, L., Fonseca, B. M., Ahmed, M., Schetinger, C. R. M., Morsch, M. V., \*Loro, L. V. Glyphosate herbicide inhibit brain acetylcholinesterase activity *in vitro* of piava (*Leporinus obtusidens*). Em fase de redação.

◆ \*Marchezan, E., \*Loro, L. V., Gonçalves, F. F., Reimche, G., Kurz, S. M., Gluszczak, L., Miron, S. D., Moraes, S. B., Fonseca, B. M., Pretto, A., Menezes, C. C. **PROJETO CT-HIDRO: MANEJO E MONITORAMENTO DOS RECURSOS HÍDRICOS VISANDO A SUSTENTABILIDADE E O USO INTEGRADO DA ÁGUA EM LAVOURAS DE ARROZ IRRIGADO.** Processo nº 503604/2003-8. Instituição executora: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA. Instituição(ões) participante(s) do Projeto: INSTITUTO RIOGRANDENSE DO ARROZ E DEPARTAMENTOS DE FITOTECNIA, QUÍMICA E DEFESA FITOSSANITÁRIA DA UFSM. Vigência do Projeto: JULHO 2004 A JULHO 2007. Área do Conhecimento: AGRONOMIA - Sub-projeto 5 – Toxicologia de pesticidas em peixes.

◆ Miron, dos S. D., Gluszczak, L., Moraes, S. B., Baldisserotto, B., \*Loro, L. V. Waterborne ammonia and pH effects on some metabolic parameters and gill histology of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Heptapteridae). **Aquaculture** AQUA-D-07-00986. Em revisão.

◆ Miron, dos S. D., Pretto, A., Crestani, M., Gluszczak, L., Loro, L. V., Schetinger, C. R. M., Morsch, M. V.\*. Biochemical effects of clomazone herbicide in piavas (*Leporinus obtusidens*). Em fase de redação.

◆ Moraes, S. B., \*Loro, L. V., Gluszczak, L., Pretto, A., Menezes, C. C., Marchezan, E., Machado, de O. S. Effects of four rice herbicides on some metabolic and toxicology parameters of teleost fish (*Leporinus obtusidens*). **Chemosphere**, 68, 1597-1601, 2007.