



CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM AQUICULTURA

Marianne Pires da Silva

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO GLIFOSATO SOBRE BIOMARCADORES DE
ESTRESSE OXIDATIVO EM JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*)**

Uruguiana

2016

Marianne Pires da Silva

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO GLIFOSATO SOBRE BIOMARCADORES DE
ESTRESSE OXIDATIVO EM JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Tecnologia em Aquicultura da
Universidade Federal do Pampa, como
requisito parcial para obtenção do Título de
Tecnólogo em Aquicultura

Orientador: Prof. Dr. Vanderlei Folmer

Co-orientadora: Mestra Andréia Caroline
Fernandes Salgueiro

Uruguiana

2016

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

S586 Silva, Marianne Pires
EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO GLIFOSATO SOBRE BIOMARCADORES DE
ESTRESSE OXIDATIVO EM JUNDIÁS (Rhamdia quelen) / Marianne
Pires Silva.
41 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação)-- Universidade
Federal do Pampa, AQUICULTURA, 2016.
"Orientação: Vanderlei Folmer".

1. Rhamdia quelen. 2. Modelo alternativo. 3. Estresse
Oxidativo. 4. Glifosato. I. Título.

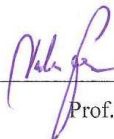
Marianne Pires da Silva

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO GLIFOSATO SOBRE BIOMARCADORES DE
ESTRESSE OXIDATIVO EM JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Tecnologia em Aquicultura da
Universidade Federal do Pampa, como
requisito parcial para obtenção do Título de
Tecnólogo em Aquicultura

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 01/07/2016


Banca examinadora:



Prof. Dr. Vanderlei Folmer

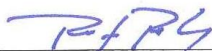
Orientador

Unipampa



Prof. Dra. Alessandra Sayuri Kikuchi Tamajusuku Neis

Unipampa



Prof. Dr. Rafael Roehrs

Unipampa

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus.

À minha mãe Celina Mara Nunes Pires, por sempre estar ao meu lado me apoiando quando precisei e me ajudando sempre que possível, só tenho a agradecer por fazer o possível e o impossível por mim.

À minha co-orientadora Andréia Caroline Fernandes Salgueiro, por ter me passado um pouco do seu conhecimento durante esses 5 anos que trabalhamos juntas, só tenho a agradecer por todos os puxões de orelha que me deu, por todos conselhos e por sua amizade. Foste muito importante na minha formação, não tenho palavras pra te agradecer.

Ao meu orientador Vanderlei Folmer, por ter me dado a oportunidade e ter aberto as portas do Laboratório de Bioquímica e Toxicologia de Produtos Naturais e Sintéticos (403).

Aos meus colegas Aline Goulart, Hemerson Rosa, Camila Vilagran e Dérick Noronha por terem cedido um pouco do seu tempo para me ajudar a realizar este trabalho, pois nem um trabalho é realizado sozinho, só tenho a agradecer pela ajuda.

Ao meu amigo que já virou um irmão, Jonathan Jardim, pela amizade, apoio e pelo companheirismo, tanto dentro quanto fora da Universidade. Muito obrigada meu grande amigo por todas as histórias, as risadas e pelo nosso inseparável chimarrão.

A Edryeise Gavião pelo companheirismo, pela bela amizade e pelas boas risadas que tivemos, só tenho a agradecer pela amizade fora e dentro da Universidade.

A Monica Navarro pela companhia, amizade e sempre disponível para me ajudar e explicar quando precisava, ao Matheus Bianchini e a Maiara Bastiani que sempre me ajudaram quando precisei.

A Maria Eduarda de Lima por ter participado da minha formação, pelos puxões de orelha, por algumas discussões, pelas risadas e pelo companheirismo, so tenho há agradecer por tudo que me ensinou.

Ao Prof. Dr. Rafael Roehrs por ter aceitado ser banca deste trabalho e a Prof.Dra. Alessandra Sayuri Kikuchi Tamajusuku Neis por ter aceitado ser banca deste trabalho e agradecer também por tudo que fez por mim durante minha graduação, sempre me ajudando em momentos fáceis e difíceis.

RESUMO

No presente estudo, utilizamos como modelo uma espécie de peixe nativa do Rio Grande do Sul, o *Rhandia quelen* (jundiá). Esta espécie se destaca como uma das mais promissoras, pois tem crescimento rápido, alta taxa de fecundação e fácil adaptação em ambientes não nativos, além de apresentar uma carne muito saborosa. O glifosato é um herbicida sistêmico, pós-emergente, que é utilizado para inibir o crescimento das plantas daninhas. Seu uso em plantações próximas a reservatórios de águas faz com que o mesmo escoe para rios e lagos, contaminando as espécies locais. Assim, este estudo objetivou avaliar os efeitos da exposição ao glifosato sobre biomarcadores de estresse oxidativo em jundiás. Para isso, alevinos de jundiás pesando em média 12 g foram expostos ao herbicida glifosato na dose de 11,29 mg/L por 30 dias. Para determinar a dose do herbicida, a DL₅₀ do mesmo foi previamente determinada em *Artemia salina*, e a dose utilizada foi de 10% da DL₅₀ encontrada. Ao final do tratamento, os animais foram sacrificados e tiveram os tecidos (cérebro, músculo, rim, fígado e sangue) removidos para análise. A biometria foi aferida quinzenalmente e os níveis de glicose e triglicerídeos foram avaliados no final do tratamento. Além disso, foram determinados os níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), grupos sulfidrílicos (SH), e a atividade das enzimas α -aminolevulinato desidratase (α -ALA-D) e acetilcolinesterase (AChE). Não foram observadas diferenças no comprimento dos animais ao longo dos 30 dias de tratamento, entretanto, houve redução do peso. Em relação aos níveis de glicose e triglicerídeos não foram observadas diferenças significativas. Nossos resultados apontam que o tratamento com dose subletal de glifosato causa estresse oxidativo em diferentes graus. Aumento nos níveis de TBA-RS foram observados no fígado e cérebro. Os níveis de SH foram aumentados no fígado, rim e cérebro, e diminuíram no músculo. A atividade da α -ALA-D foi aumentada no fígado, músculo e cérebro. Não houve diferença significativa na atividade da AChE. Com base nos resultados apresentados, podemos concluir que o herbicida glifosato, em dose subletal, causa estresse oxidativo, mas não determina alterações metabólicas significativas no jundiá.

Palavras-chave: *Rhandia quelen*; Modelo alternativo; Estresse oxidativo, Glifosato.

ABSTRACT

In this study, we use as model a native fish species from Rio Grande do Sul, the *Rhandia quelen* (catfish). This species stands out as one of the most promising because it has a rapid growth, high rate of fertilization and easy to adapt to non-native environments. Glyphosate is a systemic herbicide used to inhibit the growth of weeds. Its use, near to water reservoirs, makes it glyphosate flow into rivers and lakes, contaminating local species. This study aimed to evaluate the effects of exposure to glyphosate on biomarkers of oxidative stress in catfish. For this, catfish fingerlings weighing an average of 12 g were exposed to glyphosate herbicide at a dose of 11.29 mg/L for 30 days. To determine the dose of the herbicide, the LD₅₀ value was previously determined in *Artemia salina*. At the end of treatment, animals were sacrificed and had tissues (brain, muscle, liver, kidney and blood) removed for analysis. Biometric evaluation was performed every two weeks and the glucose and triglyceride levels were measured at the end of treatment. Moreover, we evaluate the levels of thiobarbituric acid reactive species (TBARS), sulfhydryl groups (SH), and activity of the α -aminolevulinic acid dehydratase enzyme (α -ALA-D) and acetylcholinesterase (AChE) enzyme. There were no differences in length of the animals throughout the 30 days of treatment. However, there was a reduction of weight. Regarding glucose and triglyceride levels, no significant differences were observed. Our results show that treatment with sublethal dose of glyphosate causes oxidative stress in different degrees. Increases in TBARS levels were observed in the liver and brain. SH levels were increased in the liver, kidney and brain, and decreased muscle. The activity of α -ALA-D was increased in the liver, muscle and brain. There was no significant difference in the AChE activity. Based on the results, we can conclude that the glyphosate herbicide in sublethal dose causes oxidative stress, but does not determine significant metabolic changes in the catfish.

Keywords: *Rhandia quelen*, Alternative model; Oxidative stress, Glyphosate

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fotografia do <i>Rhamdia quelen</i>	12
Figura 2 - Estrutura do Glifosato e do AMPA.....	16
Figura 3 - Fotografia da <i>Artêmia salina</i>	18
Figura 4 - Gráfico do peso corporal e comprimento.....	20
Figura 5 - Gráfico dos níveis de glicose e triglicerídeos.....	21
Figura 6 - Gráfico da análise de TBA-RS.....	21
Figura 7 - Gráfico da atividade da -ALA-D.....	22
Figura 8 - Gráfico dos níveis de GSH.....	23
Figura 9 - Gráfico da atividade da AChE.....	24
Figura 10 ó Imagem do grupo controle e glifosato.....	28

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Composição do glifosato comercial.....	17
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Rhamdia quelen	11
1.2 Herbicida Glifosato	13
1.3 Estresses oxidativo	14
2. OBJETIVOS	16
2.1. OBJETIVO GERAL	16
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1. Criação dos jundiás	17
3.2. Determinação da dose utilizada do herbicida Glifosato	17
3.3. Tratamento e obtenção e preparo dos tecidos	18
3.4. Determinação dos níveis de Glicose e Triglicérides	18
3.5. Ensaio de determinação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS)	19
3.6. Níveis de grupos sulfidrílicos (-SH)	19
3.7. Determinação da atividade da delta-aminolevulinato desidratase (-ALA-D)	19
3.8. Determinação da atividade da acetilcolinesterase (AChE)	19
3.9. Determinação de proteínas	19
3.10. Análise estatística	20
4. RESULTADOS	21
5. DISCUSSÃO	27
6. CONCLUSÕES	31
7. REFERÊNCIAS	32

1. INTRODUÇÃO

O Brasil atualmente é o país que mais utiliza produtos agrotóxicos, aproximadamente 350 mil toneladas/ano (INPEV, 2012). O uso inadequado dessas substâncias pode causar uma série de agravos para a saúde humana, levando inclusive à morte (LONDRES, 2011; KACZEWER, 2002). Entre os agrotóxicos mais utilizados está o glifosato. O glifosato é um herbicida pós-emergente, não seletivo que inibe o crescimento das plantas daninhas. O uso indiscriminado do glifosato faz com que o mesmo escoe para rios e lagos, contaminando o ambiente aquático e as espécies locais (GLIFOSATO NORSTOX, 2009; WILLIAMS et al., 2000).

O jundiá (*Rhamdia quelen*) é uma espécie nativa da região Sul, sendo considerado um peixe rústico, facilmente adaptável em ambientes não naturais e com elevada taxa de fecundação (PISCES, 2001), o que facilita seu uso em laboratório.

Já é sabido que a exposição ao glifosato desencadeia o desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e a capacidade antioxidante endógena em neutralizá-las, levando ao estresse oxidativo (MENEZES, 2010). A exposição ao glifosato pode causar inibição da atividade da AChE (SAMANTA et al., 2014) e o estresse oxidativo pode modular negativamente a atividade da enzima α -ALA-D (SALGUEIRO et al., 2016). Da mesma forma, relatos de alterações metabólicas foram descritos em *Leporinus obtusidens* (piapara) expostos ao glifosato (GLUSCZAK et al., 2006 e 2007). Em *Prochilodus lineatus* (curimba) tratados com o herbicida, foi observada inibição da atividade da AChE cerebral e ocorrência de alterações importantes na hematologia e nas defesas antioxidantes, como diminuição dos níveis de GSH (MODESTO, 2009).

Com base no exposto, o presente trabalho pretendeu avaliar os efeitos da exposição a dose subletal do glifosato sobre biomarcadores metabólicos e de estresse oxidativo em jundiás.

1.1 *Rhamdia quelen*

O jundiá (*Rhamdia quelen*)(figura 1) é uma espécie de peixe nativo do Rio Grande do Sul que se destaca como uma das mais promissoras, por ser de rápido crescimento, fácil adaptação a criação intensiva e fácil reprodução. Além disso, esse peixe possui uma carne saborosa com baixo teor de gordura e com poucas espinhas (PISCES, 2001).

O jundiá caracteriza-se por apresentar crescimento acelerado nos seus primeiros anos de vida, especialmente nos machos até o terceiro ou quarto ano de vida, quando a situação se

inverte e as fêmeas passam a crescer mais rapidamente. Morfologicamente, o mesmo apresenta três pares de barbilhões sensitivos, com comprimento que vai desde a inserção das nadadeiras peitorais até a nadadeira caudal. Os barbilhões são localizados junto a boca e possuem receptores de gosto para ajudar na localização do alimento e na percepção da qualidade da água (GOMES, 2000).

Por ser um animal rústico, o jundiá pode sobreviver em temperaturas muito baixas (até 3°C se for adaptado lentamente por vários dias). Quanto mais baixa a temperatura, menor será o metabolismo e a ingestão de alimentos e conseqüentemente seu crescimento irá diminuir ou até cessar por completo. Já, o aumento da temperatura provoca um aumento do crescimento e do metabolismo (BALDISSEROTTO, 2004). Assim uma temperatura ideal para o crescimento deste peixe seria 23°C (PIEDRAS et al., 2004).

Em relação ao ritmo circadiano, o jundiá é um peixe de hábito noturno (GOMES et al., 2000) e sua coloração pode variar de marrom-avermelhado claro a cinza ardósia, dependendo do ambiente que se encontra (BALDISSEROTTO; RADÜNZ, 2004). Para um bom crescimento, a média ideal de oxigênio dissolvido na água é de 7,5 mg/L, sendo que abaixo de 1,3 mg/L pode haver uma diminuição na sobrevivência dos jundiás (MAFFEZZOLI; NUÑER, 2006).

O jundiá pode ser encontrado naturalmente em rios, lagos, arroios e criadouros, que quase sempre são próximos a áreas de intensa agricultura, onde os herbicidas são muito utilizados e, como conseqüência, podem contaminar o ambiente aquático (PEREIRA, 2012). Assim, o jundiá pode servir como um bioindicador da qualidade da água (MATTE, 2013).

De fato, atualmente os organismos aquáticos estão continuamente sendo expostos a múltiplos contaminantes químicos, levando a efeitos adversos que podem surgir como resposta aos diferentes mecanismos de toxicidade destes produtos. Considerando a exposição de organismos aquáticos a múltiplos contaminantes químicos, pode-se investigar os efeitos desses através dos biomarcadores de estresse oxidativo (BARATA et al., 2005).

Figura 1: Espécie utilizada *Rhamdia quelen*. Foto própria



1.2 Herbicida Glifosato

O Brasil atualmente é o país que mais utiliza produtos agrotóxicos, aproximadamente 350 mil toneladas/ano (INPEV, 2012). As pessoas que apresentam maior contato com o produto são as do campo, e o maior perigo de contaminação ocorre devido ao manuseio displicente do herbicida (LONDRES, 2011). Estudos internacionais relatam que o uso do glifosato por pais pode ocasionar um número maior de abortos e nascimentos prematuros nas famílias que apresentam contato com o herbicida. O uso do glifosato pode ter efeitos na reprodução, como redução da contagem de espermatozoides em ratos, e maior índice de espermatozoides anormais em coelhos (KACZEWER, 2002).

Considerando os riscos de contaminação por agrotóxicos, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos estabeleceu um limite do glifosato em água potável de 700 µg/L. Porém, a Comunidade Européia estabeleceu como concentração máxima admissível de herbicidas para água potável um limite de 0,5 µg/L. Nessa mesma linha, o Conselho Nacional do Meio Ambiente e o Ministério do Meio Ambiente do Brasil têm colocado limites máximos de resíduos para alguns compostos, entre estes o glifosato (IAEAC, 1994; JUNIOR et al., 2002). Mesmo com estas limitações a sociedade vem sofrendo consequências devido ao mau uso dos agrotóxicos. Intoxicações são frequentes em algumas regiões e as principais ocorrências são de problemas dermatológicos, principalmente dermatite de contato, irritação de mucosas e dores de cabeça (OLIVEIRA, 2011), podendo em casos mais graves levar à morte.

O mecanismo de toxicidade dos diversos agrotóxicos é bem variável. No caso do glifosato, sabe-se que o mesmo inibe o crescimento das plantas daninhas por interferir na biossíntese de três aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano) através da inibição da atividade da enzima 5-enol- piruvil- shiquimato- 3-fosfato- sintetase (EPSPS) localizada no cloroplasto (AMARANT, et al., 2002). O herbicida glifosato expressa a sua ação diretamente na folhagem, assim afetando todo o metabolismo da planta.

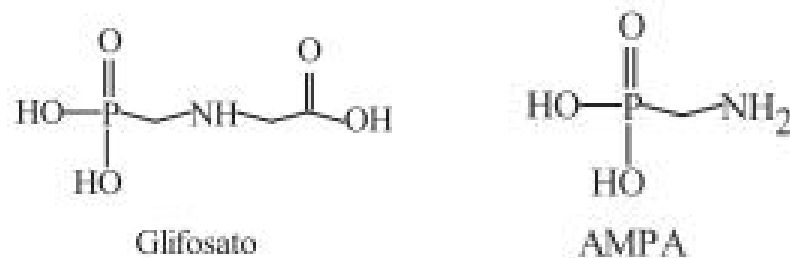
O glifosato é utilizado para controle de plantas daninhas nas culturas de ameixa, arroz, banana, cacau, cana-de-açúcar, citrus, maçã, milho, nectarina, pêra, pêssego, trigo, soja, entre muitos outros cultivos e ainda podendo ser aplicado em corpos hídricos para poder controlar plantas aquáticas onde é difícil realizar a capina manual ou mecânica (GLIFOSATO NORTOX, 2009; WILLIAMS et al., 2000).

Quando este herbicida é utilizado tanto em plantações ou em corpos hídricos acaba escoando para rios, assim prejudicando o metabolismo de peixes e invertebrados aquáticos

que são organismos mais sensíveis a este herbicida. Muitos estudos mostram os efeitos adversos do herbicida e seus componentes sobre os peixes. De fato, o glifosato pode afetar o metabolismo energético, aumentar a formação de radicais livres e afetar atividade da acetilcolinesterase (LUSHCHAK et al., 2009).

A degradação do glifosato é predominantemente no ambiente terrestre por microorganismos no solo, onde é transformado em ácido aminometilfosfônico (AMPA) (SMITH; OEHME, 1992) (figura 2).

Figura 2: Imagem retirada do artigo de LUÍZ, R.M. et al 2006



1.3 Estresses oxidativo

Estresse oxidativo pode ser definido como uma situação onde há desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e a capacidade antioxidante endógena em eliminá-las. Em situações normais, existe uma taxa basal de produção de EROS. O aumento da produção de EROS ainda pode ser benéfico nos casos de infecção, quando sua produção atua na eliminação de micro-organismos invasores. No entanto, quando produzidos de forma descontrolada as EROS lesam as células de modo direto ou danificam os ácidos nucleicos e as proteínas, tornando-os mais suscetíveis à degradação (LEITE et al., 2003). Assim, em condições patológicas a produção de EROS é excessiva e ultrapassa a capacidade de defesa antioxidante do organismo, podendo levar a alterações na estrutura das moléculas biológicas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000), isso têm sido alvo de vários estudos, onde se busca explicar a relação existente entre o aumento de EROS e as diversas doenças humanas.

Dentre os sistemas de defesa antioxidante, temos a glutathiona reduzida (GSH), o ácido ascórbico, o -tocoferol e as enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx) (REIS, et al, 2008). Os sistemas de enzimas e

antioxidantes não enzimáticos constituem principalmente um mecanismo de defesa antioxidante intracelular que compete com a produção de radicais livres eliminando o superóxido, no caso da SOD, os hidroperóxidos no caso da CAT e GPx e outras EROS que possam oxidar substratos celulares, prevenindo desta forma as reações em cadeia dos radicais livres (SHAM; MOREIRA, 2004). A glutathiona reduzida e a vitamina E podem inibir os danos oxidativos pela ação antioxidante que possuem e junto com a vitamina C e os carotenóides constituem um dos principais mecanismos de defesa exógenas e defesas endógenas do organismo (RILEY, 1994).

Outro biomarcador que não está diretamente envolvido nos sistemas de defesas antioxidantes, mas que é diretamente afetada nas situações de estresse oxidativo é a enzima - aminolevulinato desidratase (-ALA-D) (FOLMER et al., 2003). De fato, esta enzima é altamente sensível ao aumento da produção de EROS, pois possui em sua estrutura grupos sulfidrílicos que podem ser facilmente oxidados (FARINA et al., 2001).

Atualmente os organismos aquáticos estão sendo expostos a herbicidas, assim podendo causar o aumento da produção EROS via vários mecanismos, como por exemplo, interferência no transporte de elétrons na membrana mitocondrial, inativação de antioxidantes enzimáticos, diminuição de antioxidantes não- enzimáticos e peroxidação lipídica (AHMAD et al., 2000; MODESTO; MARTINEZ, 2010). Assim, biomarcadores de estresse oxidativo têm sido considerados medidas mais viáveis para avaliação rápida do estado do organismo aquático em presença de agentes estressores, como os herbicidas (HUGGETT et al., 1992).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

- Avaliar os efeitos da exposição a dose subletal de glifosato sobre biomarcadores de estresse oxidativo em jundiás.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o crescimento e peso dos animais, através de biometrias realizadas quinzenalmente
- Avaliar os níveis de glicose e triglicerídeos
- Avaliar a produção de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
- Avaliar os níveis de glutathione reduzida
- Avaliar a atividade da enzima -aminolevulinato desidratase
- Avaliar a atividade da acetilcolinesterase (AChE).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Criação dos jundiás

Jundiás, doados pelo curso de Tecnologia em Aquicultura foram criados em baldes de fibras de 15 litros, com renovação de água constante. Foram utilizados 10 animais para grupo controle e 15 animais para grupo glifosato, os animais utilizados tinham em média de 10 a 12g com um comprimento aproximado de 10 cm. Não houve separação entre machos e fêmeas por ausência de dimorfismo sexual. Os animais foram alimentados com ração comercial.

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UNIPAMPA (CEUA 032/2015).

3.2. Determinação da dose utilizada do herbicida Glifosato

Para a realização dos testes, foi utilizado glifosato comercial com as características determinadas na tabela abaixo.

A dose utilizada foi determinada a partir da avaliação da dose letal 50% (DL₅₀) em *Artemia salina* (figura 3). Para isso, náuplios de *A. salina* foram expostos a diferentes concentrações de glifosato durante 24 horas. Ao final do período foi observada a sobrevivência e determinada a dose letal para 50% dos náuplios. Esse experimento foi realizado em quintuplicata. A DL₅₀ foi estabelecida em 112,97 mg/L de glifosato. A dose utilizada para exposição dos peixes foi de 10% da DL₅₀ (11,297 mg/L). Abaixo a tabela do herbicida utilizado em nosso trabalho.

Tabela 1: Composição do glifosato comercial utilizado

GLI-UP 480 SL

Composição Quali-Quantitativa	
N-(phosphonomethy)glycine (GLYPHOSATE)	480 g/L (48,00% m/v)
Equivalente ácido	360 g/L (36,00% m/v)
Outros Ingredientes	693,3 g/L (69,63% m/v)

Figura 3: *Artêmia salina*. Foto retirada da internet



3.3. Tratamento e obtenção e preparo dos tecidos

Foram utilizados 15 peixes para o grupo glifosato e 10 peixes para o grupo controle. Os animais foram colocados em caixas de doze litros de água e adequadamente aclimatados. A cada dois dias parte da água (20%) era renovada em ambos os grupos, juntamente com o herbicida (grupo glifosato) em quantidade proporcional à água renovada. A duração do tratamento foi de 30 dias.

Os animais tiveram peso e comprimento avaliados quinzenalmente. Para isso, foi utilizado paquímetro e balança de precisão. Os animais eram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial com 36% de proteína bruta. Após finalizado o período de tratamento, os animais foram anestesiados e tiveram sangue e tecidos coletados. Para as análises foram utilizados, cérebro, músculo, fígado e sangue. Os tecidos foram homogeneizados em NaCl 0,9% na proporção de 1:5 (uma parte de tecido e quatro de NaCl 0,9%) para cérebro e músculo e 1:10 (uma parte de tecido e nove de NaCl 0,9%) para fígado. Após a homogeneização os tecidos foram centrifugados (2000 rpm; 4° C) para obtenção do primeiro sobrenadante (S1).

3.4. Determinação dos níveis de Glicose e Triglicerídeos

Os níveis de glicose e triglicerídeos foram determinados no plasma sanguíneo através de kits comerciais (Labtest ó Brasil).

3.5. Ensaio de determinação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS)

Para determinação dos níveis de TBA-RS foi utilizado o método de análise colorimétrica proposto por Ohkawa et al. (1979). A leitura foi realizada em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 532nm. Os resultados foram calculados em nmol de malondialdeído (MDA), calculados com base em uma curva padrão de MDA

3.6. Níveis de grupos sulfidrílicos (-SH)

O procedimento experimental foi desenvolvido de acordo com o método proposto por Ellman (1952), o qual se baseia na reação dos grupos -SH com o ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB) utilizado como reagente de cor. A leitura colorimétrica foi realizada em espectrofotômetro a 412 nm após 10 minutos da adição do DTNB. O conteúdo de grupos óSH foi calculado com relação aos valores encontrados em concentrações conhecidas de GSH utilizadas como padrão. Os resultados foram corrigidos pela quantidade de proteínas e expressos nmol GSH/mg tecido

3.7. Determinação da atividade da delta-aminolevulinato desidratase (-ALA-D)

A atividade da -ALA-D foi determinada seguindo o método proposto por Sassa (1982). A atividade da enzima foi monitorada em diferentes tempos (de acordo com o tecido avaliado) e a partir da adição do ácido aminolevulínico. Os resultados foram expressos em nmol de PBG (porfobilinogenio) e corrigidos pela quantidade de proteínas.

3.8. Determinação da atividade da acetilcolinesterase (AChE)

A atividade da acetilcolinesterase foi determinada de acordo com o método proposto por Ellmann et al. (1961). Brevemente, os tecidos foram homogeneizados e centrifugados a 2500 rpm durante 15 min a 4°C. O meio de reação foi preparado contendo tampão de 100 mM de KPi, pH 8,0 e DTNB 10 mM. Acetiltiocolina 8 mM foi utilizada para disparar a reação. A reação foi acompanhada por 2 min a 412 nm e a atividade foi expressa como porcentagem do controle após correção pelo teor de proteínas.

3.9. Determinação de proteínas

As proteínas foram quantificadas pelo método proposto por Bradford (1976). A leitura foi realizada em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 595nm. Os resultados foram expressos em mg de proteínas, calculados com base em uma curva padrão de albumina.

3.10. Análise Estatística

Os dados relacionados as biometrias e análises dos bioindicadores de estresse oxidativo foram submetidas ao teste t , com nível de significância de 95% ($P < 0,05$).

4. RESULTADOS

A **Figura 4** mostram a média de peso dos animais. Foi observada uma diminuição do peso em ambos os grupos. Em relação ao comprimento dos animais, não foi observada diferença significativa nesse parâmetro. Da mesma forma, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de glicose e triglicerídeos nos grupos testados (**Figura 5A e 5B**).

Figura 4: Análise do peso corporal. Asteriscos representam diferença significativa entre grupo controle e sustentado representam diferença significativa entre grupo glifosato ($p < 0,05$).

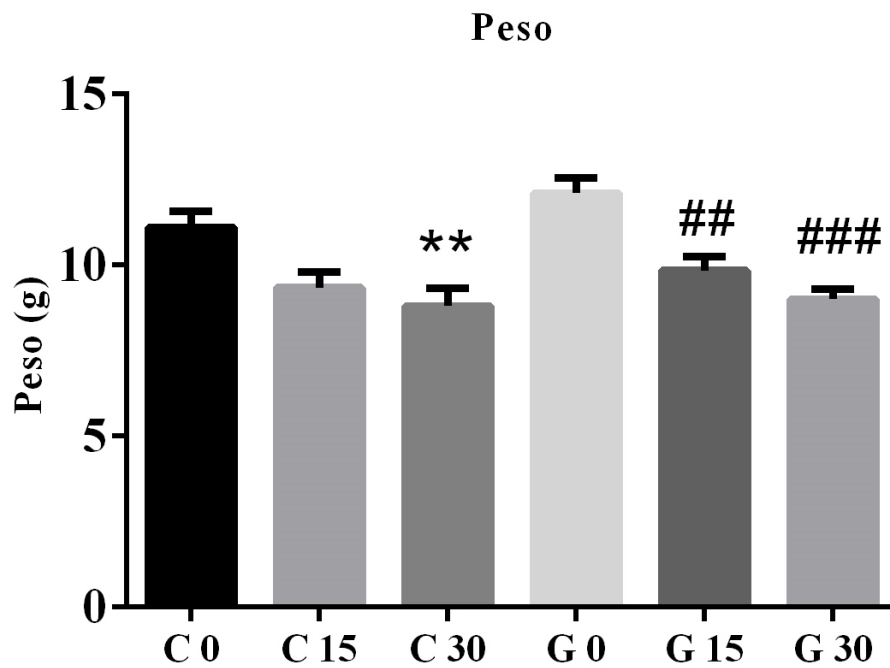
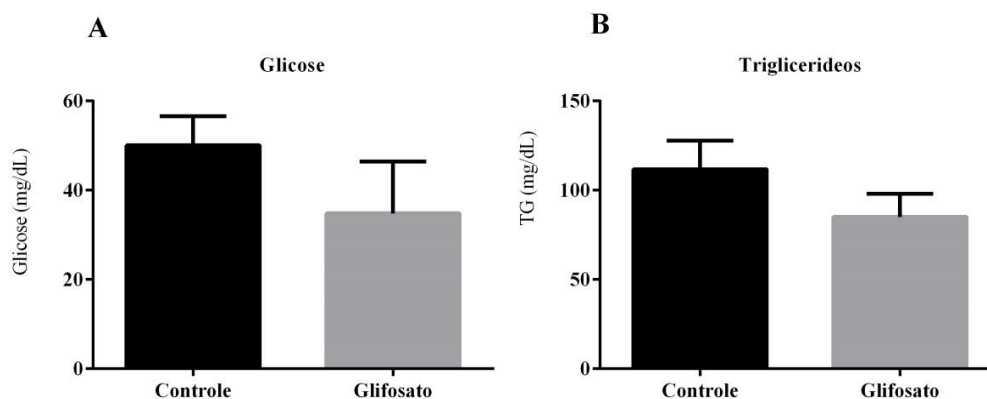
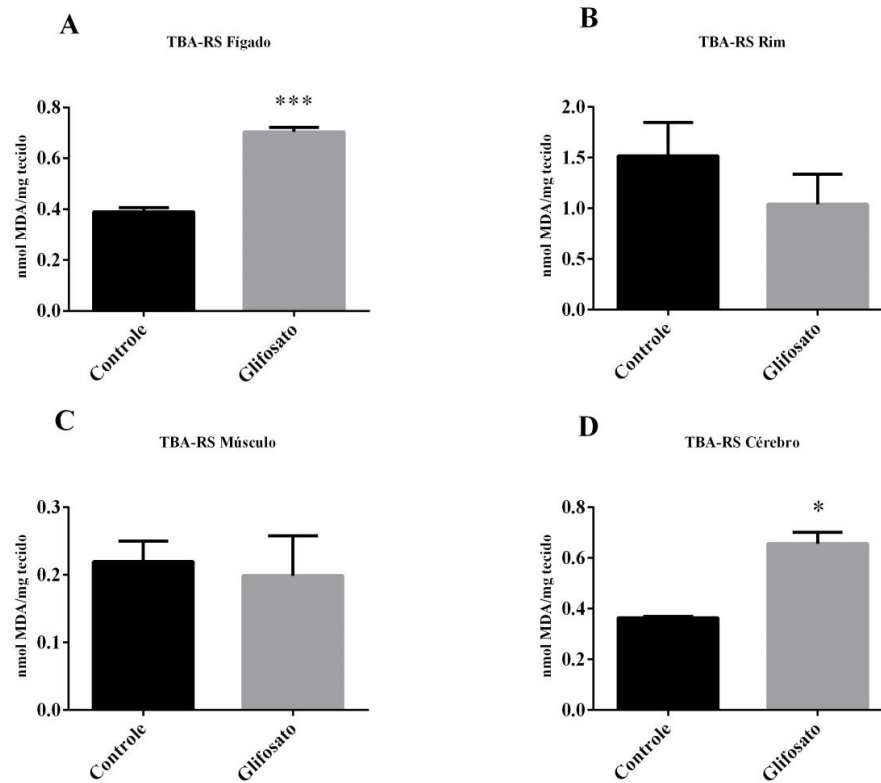


Figura 5: Níveis de glicose (A) e triglicerídeos (B).



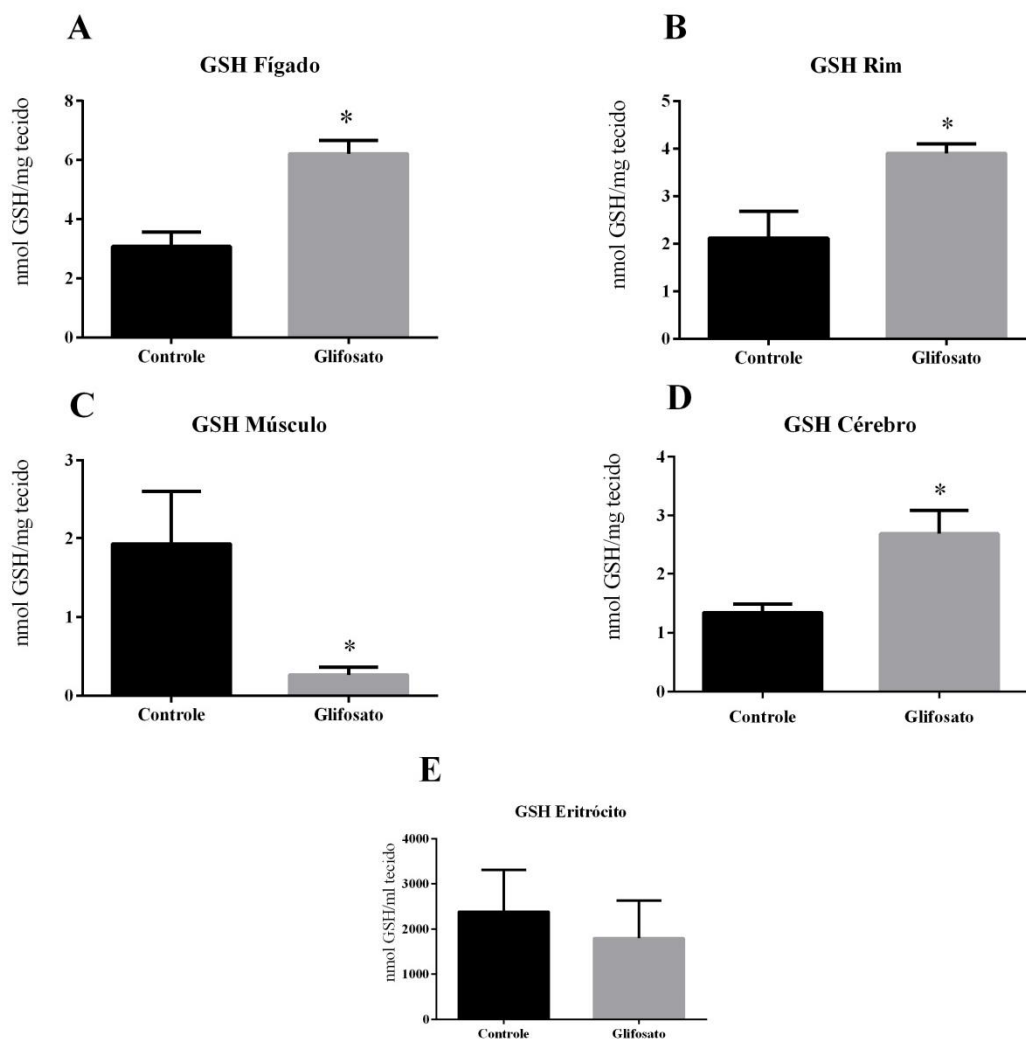
Na **Figura 6** são mostrados os níveis de TBA-RS no fígado, rim, músculo e cérebro dos animais dos grupos controle e glifosato. Podemos observar que houve um aumento da peroxidação lipídica no fígado e cérebro dos animais expostos ao glifosato (**Figuras 6A e 6D**). No rim e músculo não foram observadas diferenças significativas (**Figuras 6B e 6C**).

Figura 6: Análise de TBA-RS no fígado (A), rim (B), músculo (C) e cérebro (D). Asteriscos representam diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).



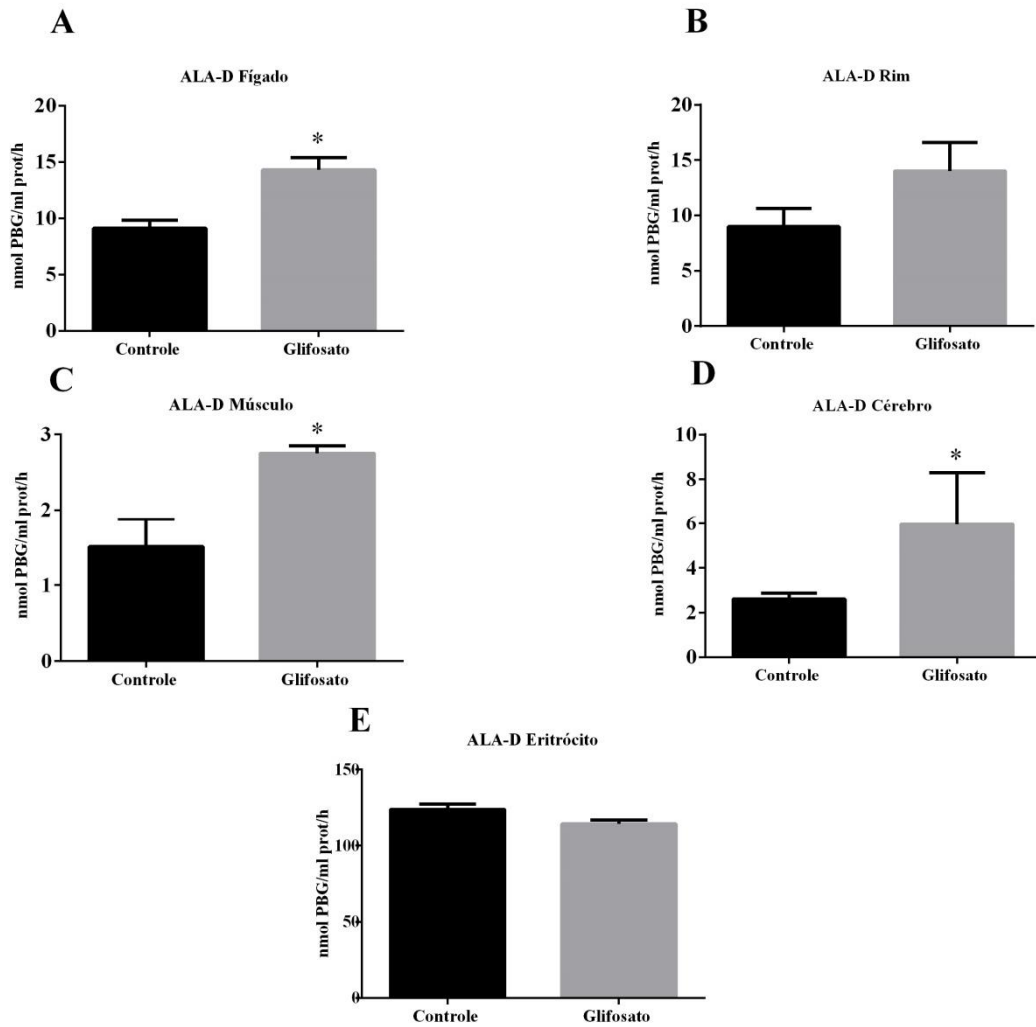
A **Figura 7** apresenta os níveis de GSH não proteicos nos tecidos avaliados. Foi observado um aumento nos níveis de GSH no fígado, rim e cérebro dos animais do grupo glifosato (**Figura 7A, 7B e 7D**, respectivamente). Já, no músculo, os níveis de grupos GSH reduziram significativamente (**Figura 7C**).

Figura 7: Análise dos níveis de GSH não proteicos no fígado (A), rim (B), músculo (C), cérebro (D) e eritrócitos (E). Asteriscos representam diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).



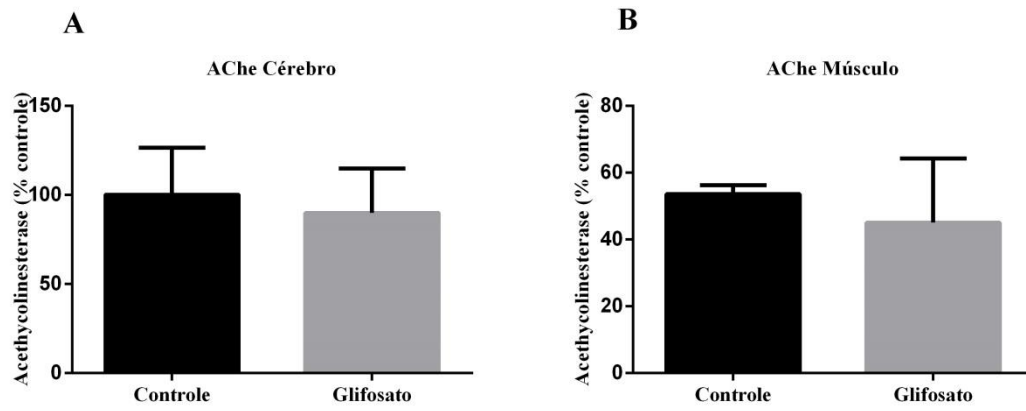
A **Figura 8** mostra os resultados da análise da atividade da enzima ALA-D nos tecidos avaliados. Foi observado um aumento na atividade da enzima no fígado, músculo e cérebro no grupo exposto ao glifosato (**Figura 8A, 8C e 8D**, respectivamente).

Figura 8: Análise da atividade da enzima ALA-D no fígado (A), rim (B), músculo (C), cérebro (D) e eritrócitos (E). Asteriscos representam diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).



Na **Figura 9** são apresentados os resultados da atividade da enzima acetilcolinesterase. Não foi observada diferenças na atividade da enzima no grupo glifosato quando comparado ao controle.

Figura 9: Atividade da enzima acetilcolinesterase no cérebro (A) e músculo (B).



5. DISCUSSÃO

Neste trabalho avaliamos os efeitos da exposição a dose subletal do glifosato em um conjunto de parâmetros metabólicos e de estresse oxidativo utilizando uma espécie nativa da região sul, o *Rhamdia quelen* (jundiá).

Podemos observar que os animais de ambos os grupos perderam peso no decorrer do experimento. Acreditamos que esta perda de peso pode ter ocorrido em virtude do espaço diminuído no ambiente de tratamento, o que caracteriza uma limitação do presente estudo. Porém, no grupo glifosato, a perda de peso foi mais significativa, pois além da limitação do espaço, havia a presença do herbicida (figura 4).

Além dos parâmetros biométricos, avaliamos aqui os níveis de glicose e triglicerídeos como indicadores do metabolismo dos animais. A glicose plasmática é usada como um indicador indireto de estresse nos peixes, mas a resposta deste indicador pode ser complexa e seu uso depende de outros fatores como, por exemplo, o agente estressor (HURVITZ et al., 1997). A glicemia reflete a condição de estresse em que o animal se encontra, pois representa a demanda energética necessária para a adaptação ao agente estressor até que se estabeleça a homeostase (WENDELAAR, 1997). Em nossos resultados, não obtivemos alterações significativas da glicose plasmática, pois pode ter ocorrido um aumento dos níveis de glicose nos primeiros dias de exposição ao herbicida, mas ao longo do tratamento pode ter ocorrido uma adaptação, assim normalizando os níveis (figura 5).

A glicose pode ser armazenada como glicogênio pelo fígado e pelo músculo e, logo após uma série de reações enzimáticas, pode ser utilizada na síntese de componentes como triglicerídeos e aminoácidos não essenciais (CHAMPE et al., 1994). Os triglicerídeos são os principais constituintes para armazenar os lipídios que desempenham um papel vital como reservas de energia para os animais e também para o fornecimento de energia para uma demanda fisiológica em animais que são submetidos ao estresse (MOYES; SCHULTE 2010). De fato, a exposição a compostos tóxicos, assim como o glifosato, pode causar alguns efeitos nocivos para a vida dos organismos, podendo induzir a oxidação e alteração na função química dos triglicerídeos (EL-BANNA et al., 2009). Nos resultados obtidos em nosso trabalho não observamos alterações nos níveis de triglicerídeos (figura 5).Alguma alteração poderia ter ocorrido logo que os animais foram submetidos ao herbicida, mas como descrito nos resultados da glicose, os animais podem ter se adaptado ao meio em que estavam vivendo.

Além disso, durante o experimento os animais não foram submetidos a outros estressores de fora do ambiente em que se encontravam.

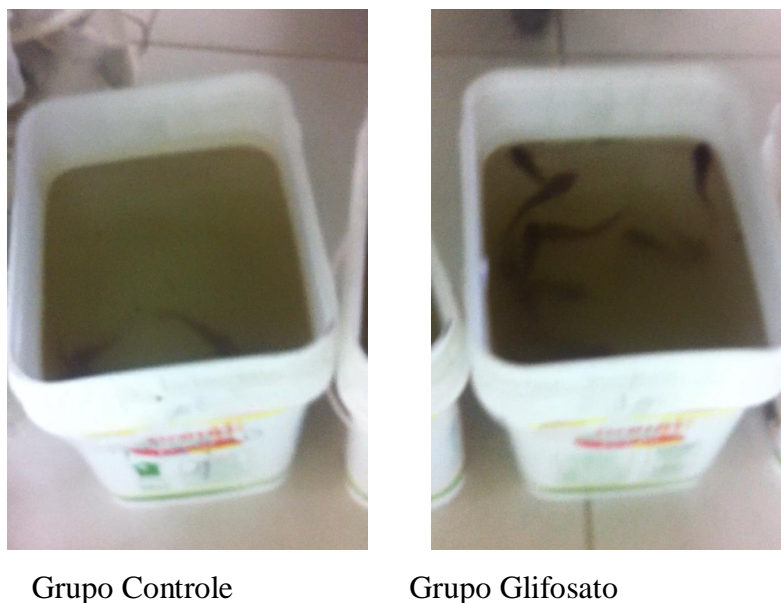
Em relação aos biomarcadores de estresse oxidativo, sabe-se que a peroxidação lipídica, em nosso estudo avaliada pelo ensaio de TBA-RS, pode se apresentar como um dos principais indicadores de estresse oxidativo. O estresse oxidativo pode ocorrer pelo desequilíbrio entre o sistema antioxidante e pró-oxidante, sendo gerado, entre outros fatores, pela toxicidade do glifosato (AHMAD et al., 2004; MIRON et al., 2008). Nesse sentido, herbicidas como o glifosato podem induzir o estresse oxidativo por aumentar a geração de radicais livres que conseqüentemente elevam as taxas de peroxidação lipídica, sendo esse um dos mecanismos envolvidos na toxicidade deste composto (CRESTANI et al., 2007). Nos nossos resultados, pudemos observar uma elevação dos níveis de TBA-RS no fígado e no cérebro, possivelmente por maior produção de espécies reativas de oxigênio nesses tecidos (figura 6) (GLUSCZAK et al., 2007).

Por outro lado, como primeiro mecanismo de defesa antioxidante podemos citar os tióis não-proteicos que apresentam uma importante função de defesa contra as espécies reativas de oxigênio. A glutathiona reduzida (GSH) é o tiol não protéico mais abundante presente nas células animais (HELOÍSA et al., 2015). A GSH tem como função proteger as células de substâncias tóxicas através da conjugação de metabólitos que inclui os xenobióticos, assim resultando em um intermediário menos tóxico que pode reduzir os danos nas células (MARAN et al., 2009). Aqui, observamos um aumento da GSH no cérebro, rim e fígado. Este aumento pode representar uma proteção contra o estresse oxidativo que foi induzido pela toxicidade do herbicida glifosato. Estudos anteriores já descreveram que o herbicida glifosato aumenta os níveis de GSH no *Rhamdia quelen* no fígado, cérebro e rim (FERREIRA et al., 2010). Nesse sentido, o órgão que apresenta um papel importante para a liberação de grandes quantidades de GSH na corrente sanguínea é o fígado. A liberação hepática de GSH faz com que o mesmo retorne aos outros órgãos, assim podendo melhorar a sua proteção ou contribuir para a desintoxicação adequada (OTTO et al., 1995). Observamos também uma diminuição da GSH no músculo, o que pode ter ocorrido pelo fato de a mesma apresentar uma importante função de oxidação/redução, transporte de aminoácidos e também na desintoxicação e proteção contra agentes tóxicos, sendo assim, é a primeira linha de defesa do organismo contra as lesões causadas pelos oxidantes (figura 7) (VAND et al., 2003).

Dentre os demais biomarcadores de estresse oxidativo que podem ser avaliados, destacamos a enzima -ALA-D. Nesse sentido, cabe ressaltar que a -ALA-D não é uma

enzima antioxidante, entretanto, a presença de grupos óSH em sua estrutura faz com que a mesma seja sensível a ação de agentes oxidantes (BÖETTECHER, 2001). A inativação ou inibição da atividade da δ -ALA-D pode ocorrer por diferentes motivos, além da oxidação dos grupos-SH, como por exemplo, pela remoção de zinco do seu sítio catalítico ou pela oxidação de proteínas constitucionais (SALGUEIRO et al., 2015). A enzima δ -ALA-D é a segunda enzima da via de biossíntese do heme, e pode ser encontrada também em animais invertebrados e vegetais, sendo precursora de moléculas de clorofila (ICGS, 2004). O heme ocorre como grupo prostético da hemoglobina, mioglobina, catalase, peroxidases e triptofânio pirrolase. Assim, integra a estrutura de proteínas que desempenham funções como o transporte de oxigênio, transporte de elétrons, detoxificação e reações de oxi-redução (BÖETTOCHER, 2001). Nos peixes, a respiração é realizada através das brânquias que são divididas em arcos, que se divergem em filamentos brânquiais, nos quais se encontram as fileiras de lamelas que são ricamente vascularizadas e são responsáveis por capturar oxigênio da água (LINS et al., 2010). O glifosato pode causar danos ao sistema de captação de oxigênio e dificultar o suprimento da demanda de oxigênio dos tecidos (MOTA et al., 2013). Este herbicida, pode ainda causar aumento da frequência de danos ao DNA de eritrócitos micronucleados após cinco a sete dias de exposição a uma concentração $1,858\text{mg/L}^{-1}$ (ARANHA, 2013). Acreditamos, que com o dano causado pelo herbicida em todos os tecidos, incluindo as brânquias que se apresentaram descoradas (dados não mostrados), os animais apresentavam dificuldades em captar o oxigênio para supri as necessidades do organismo. Isso pode estar diretamente relacionado ao aumento da atividade da enzima δ -ALA-D, para compensar a falta de oxigênio ou ainda para o processo de detoxificação do herbicida citado anteriormente. Na figura 10 (abaixo), podemos observar uma imagem do grupo controle e do grupo glifosato. Nela é possível observar que os animais do grupo glifosato mantem-se mais à superfície, o que é um comportamento não habitual nessa espécie e pode refletir a possível dificuldade na captação de oxigênio da água (figura 8).

Figura 10: Imagem do Grupo controle e do grupo Glifosato



No presente trabalho, também avaliamos a atividade da enzima AChE. Acetilcolinesterases são enzimas importantes para neurotransmissão colinérgica central e periférica, além de possuírem funções como detoxificação de xenobióticos (ROEX et al., 2003). A AChE é responsável por degradar o neurotransmissor acetilcolina regulando seus níveis (MENDEL; RUDNEY, 1943). Já foi demonstrado que a atividade da AChE pode ser inibida por vários herbicidas, tais como o glifosato. Os tecidos que são mais afetados pela inibição da AChE são cérebro e músculo (FERENCZY et al., 1997). A inibição da atividade da AChE pode levar a distúrbios do nado, do comportamento reprodutivo, da fuga de predadores, da orientação e alimentação, e até mesmo levar a morte dos animais (MIRON, 2009).

Em nossos resultados podemos observar que no cérebro houve uma pequena inibição da atividade desta enzima, mas não foi significativa (figura 9). Para o músculo também não houveram alterações significativas. Porém, durante o experimento, foi observado que os animais se mostraram com dificuldade para se orientar e para a alimentação, além de parecerem-se desorientados e com dificuldades para nadar (dados não mostrados).

6. CONCLUSÕES

Nossos resultados sugerem que o herbicida glifosato determina estresse oxidativo em jundiás em diferentes graus, dependendo do tecido analisado. No entanto, não foram observadas alterações metabólicas nos parâmetros avaliados. Nosso trabalho abre a perspectiva do uso dessa espécie como bioindicador da toxicidade do herbicida glifosato, considerando as alterações oxidativas apresentadas. Ainda, torna possível o uso desse modelo na investigação futura de possíveis agentes oxidantes e antioxidantes.

7. REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol.** V.105 p.121-126,1984

AHMAD, I., PACHECO, M., SANTOS, M. A. Enzymatic and enzymatic antioxidants as an adaptation to phagocytes induced damage in *Anguilla*. **Ecotoxicol Environ saf.** 57,290-295, 2004.

AHMAD, I., et al. 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.

AMARANTE JR. O. P., SANTOS, T.C.R., BRITO, N.M., RIBEIRO, M.L. Glifosato: Propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova.** V.25 n°5 589-593, 2006.

ARAÚJO, F. G. **Ácidos graxos dietéticos em parâmetros reprodutivo de fêmeas de Zebrafish(Danio Rerio).**2012. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais).Universidade Federal de Lavras,2012.

ARANHA, R. C. **Potencial de toxicidade dos herbicidas glifosato e imazetapir em *colossoma macropomum* (pisces).** 2013. 105 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) Universidade Federal do Oeste do Pará, 2013.

BARCELLOS, L. J. G. et al Haematologia and biochemical characteristics of male jundiá(*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard Pimelodidae) and hormonal and biochemical changes after acute stress. **Aquaculture Research.** V.34, p. 1465-1469. 2003.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Analytical Biochemistry;** v.72 p. 248-254, 1976

BALDISSEROTTO, B.; NETO, J.R. **Criação de Jundiá**. Universidade Federal de Santa Maria.2004.

BARBAZUK,W.B. et al.The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. **Genome Research**. V.10:p.1351-1358,2000

BIANCHI, M. L .P.;ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista Nutrição Campinas**,1999

BARREIROS, A.L.B.S., DAVID, J.M., DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Sociedade Brasileira de Química**, V. 29, p.113-23. 2006.´

BARATA, C. et al. Antioxidante enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. **Comparative Biochemistry and Physiology** ,v.140, p.175-186, 2005.

BECHARA, E. J. H. et al. A free radical hypothesis of lead poisoning and inborn porphyrias associated with 5-aminulevulinic acid overload. **Química Nova**. v.16 p. 385-392, 1993.

BOMBARDELLI, R. A. et al. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá cinza, *Rhamdia quelen*. **Revista Brasileira de Zootecnia** v.35 n°4, p. 1251-1257,2006.

BOETTCHER, A. C. **Efeito inibitório de formas orgânicas e inorgânicas de selênio sobre a atividade da enzima -aminolevulinato desidratase de fígado e branquias de peixe-jundiá (*Rhamdia quelen*) e de fígado de rato (*Rattus novergicus*) ãin vitroö**. 2001. 155 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001.

BUHL, R. et al. Oxidant-protease interaction in the lung; Prospects of antioxidant therapy. **Chest**, v.110, p.276S-272S, 1996.

CHAMPE, P. C. ,HARVEY, R. A. Lippincottø illustrated reviews: biochemistry. **Philadelphia Lippincott**, v.20 , 1994.

CRESTANI, M. et al. Effect of clomazone herbicide on biochemical and histological aspects of silver catfish(*Rhamdia quelen*) and recovery pattern. **Chemosphere**, v,67,p.2305-2322,2007.

DIANA, M. E., OTTO; THOMAS,W.MOON. 3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl effects on antioxidant enzymes and glutathione status in different tissues of Rainbow trout. **Rev. Pharmacology & Toxicology** ,Ottawa Carleton Institute of Biology, Department Biology, University of Ottawa.1995.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives Biochemistry Biophysics**. V.82 p.706-77, 1952

ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical. Pharmacology**. v.7 p.88-95, 1961.

EL-BANNA, S. G. et al. Effect of garlic consumption on blood lipid and oxidant/ antioxidant parameters in rat males exposed to chlorpyrifos. **Slovak Journal of Animal Science**. v.42 p.111-117, 2009.

FARINA, M. et al. Selenoxides inhibit d-aminolevulinic acid dehydratase. **Toxicology Letters**. v.119 p.27-37, 2001.

FERREIRA, D. et al. Assessment of oxidative stress in *Rhamdia quelen* exposed to agrichemical. **Chemosphere** v.79 p.914-921, 2010.

FERENCZY, J. et al. Characterization of acetylcholinesterase and its molecular forms in organs of five freshwater teleosts. **Fish Physiology and Biochemistry**. V.16 p. 515-529,1997.

FERREIRA, D. **Parâmetros de estresse oxidativo e estudo de lesões histopatológicas em jundiás(*Rhamdia quelen*) expostos a agroquímicos**. 2010. 58 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia)Universidade federal de Santa Maria, 2010.

FOLMER, V. et al. A high fat diet inhibits delta-aminolevulinate dehydratase and increases lipid peroxidation in mice (*Mus musculus*). **The Journal of Nutrition**. v.133 p. 2165-70, 2003

GILBERT, M. J.H .;ZERULLA, C.; TIEMEY, K. B. Zebrafish(*danio rerio*)as a model for the study of aging and exercise:Physical ability and trainability decrease with age. **Experimental Gerontology**. v.50 p.106-113, 2014.

GLIFOSATO NORTOX. Disponível em:<www.nortox.com.br>.Acesso em: 13 de abril,2016

GLUSCZAK, L. et al.Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Comparative Biochemistry Physiology**. v.146 p.519-524, 2007.

GLUSCZAK, L. et al. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*).**Ecotoxicology and Environmental Safety** .v.65 p. 2376241, 2006.

GOMES, L. C. et al. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). **Ciência Rural**. v..30, n.1, p.79-185. 2000.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Ed.50, Oxford University Press: New Youk, 2000.

HELOÍSA, H. P. O. et al. Mixtures of benzo(a) pyrene, dichlorodiphenyltrichloroethane and tributyltin are more toxic to neotropical fish *Rhamdia quelen* than isolatd exposures. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.122 p.106-115,2015.

HURVITZ, A., BERCOVIER,H., RIJN, J.V. Effect of ammonia on the survival and the immune response of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) vaccinated against streptococcus iniae. **Fish & Shellfish Immunology**, v.7,p.45-53, 1997.

HUGGET, R.J. et al. Biomarkers: Biochemical, Physiological and Hystological Markers of Antropogenic Stress. Boca Raton. **Lewis Publishers** cap.4 p.155-196, 1992.

INTERNATIONAL COUNCIL FOR THE EXPLORATION OF THE SEA. **ICES**. Biological effects of contaminants: Quantification of -aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) activity in fish blood. By K. Hylland. **ICES Techniques in Marine Environmental Sciences**, Copenhagen, n. 34, 9 p. 2004.

International Association of Environmental Analytical Chemistry; Em **Sample Handling of Pesticides in Water**; Active: Barcelona, 1994.

JUNIOR, O. P. A. et al . Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Quimica Nova**, v. 25 p.589-593, 2002.

KO,J.Y. et al. Protective effect of aquacultured flounder fish derived peptide against oxidative stress in zebrafish. **Fish e Shellfish Immunology**. v.36 p.320-323, 2013.

KALLUEFF, A. V.; STEWART, A. M.; GERLAI, R. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. **Trends in Pharmacological Sciences**. v, 35 p.63-75 2012.

KACZEWER, J. **Toxicología del Glifosato**: Riesgos para la salud humana. 2002. Disponível em:
<http://www.ecoportall.net/Temas_Especiales/Salud/Toxicologia_del_Glifosato_Riesgos_para_la_salud_humana>. Acesso em: 03 Junho 2016.

KOSTYUK, V. A.; POTAPOVITCH, A. L. Superoxide-driven Oxidation of Quercetin and a Simple Sensitive Assay for Determination of Superoxide Dismutase. **Biochemistry International**. v.19 p.1117-1124. 1989

LEITE, H. P.; SARNO,R.S. Radicais livres, anti-oxidantes e nutrição. **Revista Brasileira de Nutrição**. 2003.

LUSHCHAK, O.V. et al. Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative in goldfish tissues. **Chemosphere**. v.76,p.932-937, 2009.

LOPES, A. R. et al. Oxidative stress in deep scattering layers: Heat shock response and antioxidant enzymes activities of myctophid fishes thriving in oxygen minimum zones. **Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers**. v.82 p.10-16,2013.

LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida**. Rio de Janeiro: AS-PTA Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativas, 2011.

LUÍS, R.M; TONI,H.S;DIMAS, A.M.Z. Adsorção de glifosato sobre solos e minerais. **Química Nova**. v.29 p.829-833, 2006.

MCCORMICK, D. B; GREENE, H.L. Vitamins: ascorbic acid. In: Burtis, C.A. & Ashwood, E.R. (eds.). **Tietz Textbook of Clinical Chemistry**. ed.2 Filadélfia: W.B. Saunders, 1994 p. 1311-1316.

MAFFEZZOLLI, G.; NUÑER, A. P. O. Crescimento de alevinos de Jundiá, *Rhamdia quelen* (Pisces, Pimelodidae), em diferentes concentrações de oxigênio dissolvido. **Acta Scientiarum, Biological Sciences**, v. 28 p. 41-45, 2006.

MAHABIR, S.; CHATTERJEE, D.; GERLAI, R. Strain dependent neurochemical changes induced by embryonic alcohol exposure in zebrafish. **Neurotoxicology and Teratology**. v.41 p.1-7,2014.

MARAN, E., FERNÁNDEZ, M., BARBIEI, P., FONT, G., RUIZ, M. J. Effects of four carbamate compound on antioxidant parameters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.72 p.922-930,2009.

MATTE, V. L. **Efeito da ação de agroquímicos e do estresse sobre o metabolismo de carboidratos de jundiás (*Rhamdia quelen*)**. Centro Universitário La Salle, 2013.

MENEZES, C.C. **Parâmetros de estresse oxidativo em Jundiás (*Rhamdia quelen*) exposto a formulações comerciais dos herbicidas glifosato e clomazone**. 2010. 86 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica toxicológica) Universidade Federal de Santa Maria, 2010.

MIRON, D. S. et al. Biochemical effects of clomazone herbicide on piava (*Leporinus obtusidens*). **Chemosphere**. v.74 p.1-5, 2008.

MIRON,D.S. Respostas metabólicas e enzimáticas em jundias *Rhamdia quelen* (heptapteridae) e piavas *Leporinus obtusidens* (anostomidae) expostos a herbicidas utilizados na cultura do arroz irrigado.2009.

MENDEL, B., RUDNEY, H. On the type of cholinesterase present in brain tissue. **Science**, v.98,p.201-202, 1943.

MODESTO, K.A. **Efeitos de dois herbicidas á base de glifosato para um peixe neotropical com enfoque nos biomarcadores bioquímicos**. 2009. 80 f. Dissertação (Metrado em ciências biológicas) Universidade Estadual de Londrina,2009.

MODESTO, K. A., MARTINEZ, C. B. R. Roundup causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**. v.78 p. 294-299, 2010.

MOTA, S. B., HENRIQUE, S. H., VAL, A. F. M. V. Avaliação da toxicidade aguda do roundup® em juvenis de tambaqui (*colossoma macropomum*) **II Congresso de Iniciação Científica PIBIC/CNPq - PAIC/FAPEAM**, 2013.

MOYES, C. D., SCHULTE, P. M. **Princípios de fisiologia animal**. Ed.2 p.526-571, 2010.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGY, K. Assay for lipid peroxides in animal tissue es by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**. v.95 ,p. 351-358, 1979.

OLIVEIRA, R.L. **O uso dos agrotóxicos e seus efeitos nocivos para o meio ambiente e para a saúde dos agricultores dos sítios curral grande,coatigereba, folha, ipioca e pirpiri no município de Itapororoca/PB**. 2001. 47 f. Monografia (Graduação em Geografia) Universidade Estadual da Paraíba. 2011.

OLSEN, A.S.; BScI, SARRAS, M.P.; PhD Jr.; Intine, R.V. Limb regeneration is impaired in an adult zebrafish model of diabetes mellitus. **Wound Repair and Regeneration**. v.18 p.532-542, 2010.

OTTO, D. M; THOMAS, W. MOON. 3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl effects on antioxidant enzymes and glutathione status in different tissues of Rainbow trout. **Pharmacology and Toxicology**. v.77 p.281-287, 1995.

PÁDUA, B. C. **Efeito antioxidante do extrato hidroalcoólico de *Baccharis trimera*: Uma avaliação *in vitro* e *in vivo***. 2010. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) Universidade Federal de Ouro Preto, 2010.

PEREIRA, L.S. **Avaliação da toxicidade do herbicida atrazina em jundiás (*Rhamdia quelen*) através de biomarcadores bioquímicos e morfológicos**. 2012. 52 f. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) Universidade Federal do Paraná, 2012.

PISCES, P. Diferentes fontes de lipídios testadas na criação de larvas e jundiá (*Rhamdia quelen*). **Ciência Rural**. v.31 p.129-133, 2001.

PIEDRAS, S. R. N. et al. Efeito da temperatura e da saturação de oxigênio na taxa de crescimento específico do jundiá na fase de engorda. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE AQUICULTURA E BIOLOGIA AQUÁTICA ó AQUIMERCO 2004, **Anais...** Vitória, 24-28/mai./2004.

REIS, J. S. et al. Estresse Oxidativo: Revisão da Sinalização Metabólica no Diabetes Tipo 1. **Arq. Brasileira Endocrinol. Metabolismo** v.52 p.1096-1105, 2008.

RILEY, P. A. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. **International Journal of Radiation Biology, London**, v.65 p27-33, 1994.

RYTER, S.W., TYRRELL, R. M. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. **Free Radical Biology Medicine** v.28 p.289-309, 2000.

ROEX, E.W.M., KEIJZERS, R., VAN GOSTEL, C.A.M. Acetylcholinesterase inhibition and increased food consumption rate in the zebrafish, *Danio rerio*, after chronic exposure to parathion. **Aquatic Toxicology**. v.64 p.451-460, 2003.

RYTER, S.W., TYRRELL, R. M. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. **Free Radic. Biol.Med.** v.28 p.289-309, 2000.

SALGUEIRO, A.C.F. et al. Effects of Bauhinia forficata Tea on Oxidative Stress and Liver Damage in Diabetic Mice, **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v.2016 p.9, 2015.

SAMANTA, P., PAL, S., MUKHERJEE, A. K, M., GHOSH, A. R. Biochemical effects of glyphosate based herbicide, Excel Mera 71 on enzyme activities of acetylcholinesterase (AChE), lipid peroxidation (LPO), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) and protein content on teleostean fishes. **Ecotoxicology and Environmental Safety** v.107 p.120-125, 2014

SASSA, S. Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay. **Enzyme**. v.28 p.133-145, 1982.

SILVA, J.P.G.C. **O efeito da dieta na sobrevivência e no desenvolvimento esquelético e digestivo de larvas e juvenis de peixe-zebra**. 2009. 98 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Marinha). Universidade do Algarve, 2009.

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

SHAMI, N.J.I.E., MOREIRA, E.A.M. Lycopene as an antioxidant agent. **Revista de nutrição**. V.17 n°2, 2004.

TREVISAN, R. **Marcadores de estresse oxidativo e outros parâmetros biológicos em peixes e bivalves como ferramentas de monitoramento ambiental: Análise de dois ecossistemas catarinenses**. 2008. 70 f. Monografia (Graduação em ciências Biológicas). Universidade Federal de Santa Catarina, Julho 2008.

VAN DER OOST, R., BEYER, J., VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment a review. **Environ Toxicology. Pharmacology.** v.13 p.57-149, 2003.

WENDELLAR, B. The stress response in fish. **Physiological reviews.** V.77 p.591-625, 1997.

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